

**cDNA-Klonierung einer
Prenyltransferase aus der Arzneipflanze
*Hypericum perforatum***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte

Dissertation

von Susanne Kühle
aus Magdeburg

1. Referent: Professor Dr. Ludger Beerhues

2. Referentin: Professor Dr. Ute Wittstock

eingereicht am: 09.09.2009

mündliche Prüfung (Disputation) am: 21.10.2009

Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge in Form eines Kurzvortrags

Kühle, S., Beerhues, L.: Prenylation Reactions in Hyperforin biosynthesis.
DPhG-Doktorandentagung, Nürnberg-Heroldsberg (2006)

Tagungsbeiträge in Form von Posterpräsentationen

Kühle, S., Beerhues, L.: Prenylation reactions in hyperforin biosynthesis.
Botanikertagung, Hamburg (2007)

Kühle, S., Beerhues, L.: Aromatic Prenyltransferases of *Hypericum* species.
Jahrestagung der DPhG in Gemeinschaft mit der Österreichischen Pharmazeutischen Gesellschaft (ÖPhG) und der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung (GA), Erlangen (2007)

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ludger Beerhues, danke ich herzlich für die Überlassung des spannenden und herausfordernden Themas, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die stete Bereitschaft zu interessanten Diskussionen.

Ich danke Frau Prof. Dr. Ute Wittstock für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Bei Prof. Dr. Benye Liu bedanke ich mich für viele hilfreiche Hinweise und Ideen zur Durchführung der Arbeit. Dr. Rainer Lindigkeit danke ich für die Soforthilfe bei PC-Problemen und viele erheiternde Gespräche. Dr. Till Beuerle danke ich für seinen wertvollen Rat bei allen analytischen Problemen.

Allen Mitarbeitern des IPB danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und den herzlichen zwischenmenschlichen Umgang. Besonders erwähnt seien Dr. Helge Scharnhop, Dr. Nora Feye, Ines Rahaus. Dr. Zakia Boubakir, Dr. Torben Räth und Andreas Müller, mit denen ich auch außerhalb des Instituts viele schöne Stunden genießen durfte.

Außerdem danke den Kollegen Dr. Simone Schröder, Dr. Hendrik Stuckenbrock und Phillip Hasemann vom Institut für Pharmazeutische Chemie für die unvergesslichen Tagungsreisen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Inis Winde und Antje Plock für ihre wunderbare Freundschaft. Ohne den PKW wäre ich so manches Mal auf der Strecke geblieben.

Ich danke meiner Familie und langjährigen Freunden für ungezählte aufmunternde Worte, viel Verständnis und Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Botanik von <i>Hypericum perforatum</i> L.....	1
2.	Geschichte und Mythos.....	2
3.	Inhaltsstoffe	3
3.1.	Phloroglucinole	3
3.2.	Naphthodianthrone	4
3.3.	Flavonoide.....	5
3.4.	Weitere Inhaltsstoffe.....	6
4.	Pharmakologie von Hyperforin	7
4.1.	Antidepressive Wirksamkeit	7
4.2.	Antibakterielle und entzündungshemmende Aktivität.....	9
4.3.	Antitumorale Wirksamkeit.....	9
4.4.	Enzyminduktion	10
5.	Biosynthese	10
6.	Ziel der Arbeit	12
II.	Material	13
1.	Biologisches Material	13
1.1.	Pflanzenmaterial	13
1.2.	Zell- und Gewebekulturen.....	13
1.3.	Bakterien und Plasmide	14
1.3.1.	Bakterienstämme	14
1.3.2.	Plasmidvektoren	14
1.3.3.	Bacterial Artificial Chromosome (BAC)	14
1.4.	Enzyme	14

2.	Nukleinsäuren und Nukleotide	15
2.1.	Oligonukleotide.....	15
2.1.1.	Degenerierte Oligonukleotide.....	15
2.1.2.	Genspezifische Oligonukleotide	15
3.	Kits für die Molekularbiologie	17
4.	Chemikalien, Reagenzien , Kulturmedien, Lösungen und Puffer	17
4.1.	Chemikalien und Reagenzien	17
4.2.	Kulturmedien	19
4.2.1.	Kulturmedien für Pflanzenzellkulturen	19
4.2.2.	Kulturmedien für Bakterienkulturen.....	20
4.3.	Lösungen und Puffer	21
4.3.1.	Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese.....	21
4.3.2.	Puffer zur Plasmidisolierung.....	22
4.3.3.	Puffer und Reagenzien zur RNA Isolierung.....	22
4.3.4.	Sonstige Lösungen.....	23
5.	Geräte	24
III.	Methoden	25
1.	Methoden der Biochemie	25
1.1.	Zellfreie Extrakte aus Pflanzenmaterial	25
1.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	25
1.3.	Enzyminkubation.....	25
1.3.1.	Inkubationsansatz.....	26
2.	Instrumentelle Analytik.....	26
2.1.	Dünnschichtchromatographie (DC).....	26
2.2.	High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC).....	26
2.2.1.	Instrumentierung.....	27

2.2.2.	Gradientenprogramm	27
3.	Synthese und Aufreinigung von Dimethylallylpyrophosphat	28
3.1.	Synthese	28
3.2.	Aufreinigung des Synthese-Gemisches	28
4.	Methoden der Molekularbiologie	29
4.1.	Kultivierung von <i>E. coli</i>	29
4.2.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	29
4.3.	Design von Oligonukleotiden	29
4.4.	Isolierung von RNA	30
4.4.1.	Isolierung von poly (A ⁺)-RNA	30
4.4.2.	Isolierung von Gesamt-RNA	30
4.4.3.	Isolierung von Gesamt-RNA bei sekundärstoffreichen Pflanzenproben	
	31	
4.5.	Reverse Transkription	31
4.5.1.	cDNA-Synthese mittels SMART-RACE-Verfahren	31
4.5.2.	Synthese von 5'-cDNA mittels Terminaler Transferase	32
4.6.	Isolierung von DNA	32
4.7.	PCR (Polymerase-Chain-Reaction)	32
4.7.1.	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	33
4.7.2.	RT- PCR	34
4.7.3.	Semi-Nested PCR mit TATA-Box Primer	34
4.7.4.	SiteFinding PCR	34
4.8.	Agarose- Gelelektrophorese	35
4.9.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	35
4.10.	Restriktionsverdau	36
4.11.	Ligation von DNA-Fragmenten	36
4.11.1.	Klonierung in das pGEM-T Easy Vektor System	37

4.12.	Transformation von <i>E. coli</i>	37
4.13.	Isolierung von Plasmid-DNA.....	37
4.14.	Insertionskontrolle	38
4.15.	Quantifizierung von Nukleinsäuren	38
4.16.	Herstellung eines T-Überhangvektors	39
4.17.	DNA-Sequenzierung	39
4.17.1.	Probenvorbereitung	40
4.17.2.	PAGE für die DNA-Sequenzierung	40
4.18.	Auswertung von DNA-Daten	41
IV.	Ergebnisse	42
1.	Nachweis von Prenyltransferase-Aktivität in <i>Hypericum perforatum</i> - Sprosskulturen.....	42
1.1.	Detektion von Enzymaktivität.....	42
1.2.	Spezifische Aktivität	44
2.	Klonierung von Prenyltransferase-cDNA-Fragmenten aus <i>H. perforatum</i>	44
2.1.	Design degenerierter Oligonukleotide	45
2.2.	Gewinnung von poly (A ⁺) RNA.....	45
2.3.	Amplifikation eines Prenyltransferase-Fragments.....	46
3.	Organspezifische Expression	50
4.	Amplifikation des 3´-Endes mittels RACE-Technik.....	52
5.	Verlängerung der PT-cDNA in Richtung des 5´- Endes.....	55
5.1.	Verwendung der 5´-RACE Technik	55
5.2.	Modifizierte RACE-PCR mittels Terminaler Transferase.....	58
6.	Versuche zur Sequenzverlängerung mit genomischer DNA	59
6.1.	Semi-Nested PCR mit degeneriertem TATA-BOX-Primer.....	59
6.2.	SiteFinding-PCR	60
6.3.	Sequenzierung eines BAC-Klons	62

7. Vorhersage von Transmembrandomänen	65
V. Diskussion.....	66
VI. Zusammenfassung	86
VII. Literatur	88
VIII. Anhang.....	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Hypericum perforatum</i> L.	2
Abbildung 2: a) Hyperforin b) durchscheinende Ölbehälter im Blatt.....	4
Abbildung 3: a) Hypericin und b) ausgequetschter roter Zellsaft.....	5
Abbildung 4: Flavonide aus <i>Hypericum perforatum</i>	6
Abbildung 5: Xanthone aus <i>Hypericum perforatum</i>	7
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Wiederaufnahmehemmung an der Synapse ..	9
Abbildung 7: Reaktionen von Polyketidsynthasen aus Johanniskraut	11
Abbildung 8: Erster Prenylierungsschritt der Hyperforin-Biosynthese.....	12
Abbildung 9: Zellkultur von <i>H. calycinum</i>	13
Abbildung 10: Chromatogramme der HPLC-Analyse von Prenyltransferase-Ansätzen	43
Abbildung 11: Erster und zweiter Prenylierungsschritt des Phlorisobutyrophenons	44
Abbildung 12: Lage der degenerierten Primer in konservierten Regionen von Prenyltransferasen	45
Abbildung 13: Steigender Hyperforingehalt in Knospen von <i>H. perforatum</i>	46
Abbildung 14: Schema der PCR mit degenerierten und RACE-Primern	47
Abbildung 15: Schema der PCR mit degenerierten Primern	48
Abbildung 16: a) Aminosäurenabgleich des aus <i>H. perforatum</i> amplifizierten Fragments mit bekannten Prenyltransferasen. Von der <i>H. perforatum</i> -Sequenz abweichende Aminosäuren sind rot unterlegt. b) Prozentuale Übereinstimmung	49
Abbildung 17: PT-Expression in verschiedenen Pflanzenorganen	50
Abbildung 18: Erwartete Fragmentgröße zwischen Primer Pren AS1 (rot) und Pren S1 (grün).....	51
Abbildung 19: Schema der 3´-RACE.....	53
Abbildung 20: Primerkombinationen für die Nested-3´-RACE PCR	54
Abbildung 21: Schema der 5´-RACE.....	56
Abbildung 22: Primerkombinationen für die nested 5´-RACE PCR.....	58
Abbildung 23: Schematische Darstellung der semi-nested TATA-BOX-PCR	60
Abbildung 24: Schematische Darstellung der SiteFinding PCR nach (Tan et al. 2005)	61
Abbildung 25: Screening einer BAC-Bibliothek	62
Abbildung 26: Vektor-Karte des pBluescript SK+ Vektors von Stratagene	64
Abbildung 27: Voraussichtliche Transmembrandomänen in der bisherigen PT- Aminosäuresequenz.....	65
Abbildung 28: Bildung des Hyperforingrundgerüsts	67
Abbildung 29: Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg	68
Abbildung 30: Vorgeschlagener Ablauf der Hyperforinbiosynthese (Beerhues 2006)	69
Abbildung 31: Hyperforin und Homologe.....	70
Abbildung 32: Einteilung von Prenyltransferasen.....	71

Abbildung 33: Mechanismus der Kettenverlängerung	72
Abbildung 34: Strukturen einiger Monoterpene	73
Abbildung 35: Reaktionen von Polyprenyltransferasen (Heide 2009).....	75
Abbildung 36: Modell des aktiven Zentrums der UbiA (Bräuer et al. 2008)	76
Abbildung 37: Reaktionen von ABBA Prenyltransferasen (Heide 2009).....	77
Abbildung 38: Von Prenyltransferasen aus <i>Aspergillus fumigatus</i> katalysierte Reaktionen (Kremer and Li 2008).....	78
Abbildung 39: Von Prenyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels katalysierte Reaktionen (Heide 2009).....	80
Abbildung 40: Prenylierung von Olivetolsäure in <i>Cannabis sativa</i>	81
Abbildung 41: Biosynthese von Bittersäuren im Hopfen (Zuurbier et al. 1998).....	82
Abbildung 42: Vergleich der Aminosäuresequenzen des <i>H. perforatum</i> -Enzyms mit bekannten Prenyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels	84

I. Einleitung

1. Botanik von *Hypericum perforatum* L.

Das Tüpfel-Johanniskraut gehört zur Familie der Clusiaceae, die bis vor einigen Jahren noch als Familie der *Hypericaceae* bezeichnet wurde. Die Familie umfasst 37 Gattungen und 1610 Arten (Umek et al. 1999). Ungefähr 450 Arten gehören der Gattung *Hypericum* an. *Hypericum perforatum* ist eine ausdauernde gelb blühende krautige Pflanze mit stark verästelter Wurzel und einem Rhizom [Abbildung 1]. Sie ist in Europa heimisch, jedoch seit Jahrhunderten weltweit verbreitet. Die Pflanze erreicht eine Höhe von 30 bis 80 cm und blüht zwischen Juni und August. Der Fruchtknoten ist oval und oberständig. Daraus bildet sich eine 5 bis 10 mm große riefelige Spaltkapselfrucht, die sich mit zunehmender Reife von grün nach braun verfärbt, schließlich aufspringt und die ca. 1 mm langen schwarzen Samen freigibt. Der zweikantige Stängel ist hart, woraus sich die volkstümliche Bezeichnung „Hartheu“ ableitet. Daran sind die oval-eiförmigen Blätter gegenständig angeordnet. Sie erscheinen aufgrund zahlreicher schizogener Ölbehälter im Gegenlicht perforiert. Am Blattrand sind außerdem schwarze Ölbehälter lokalisiert, die auch in großer Zahl in den trugdoldigen Blütenständen zu finden sind. Zerquetscht man die Blüten zwischen den Fingern tritt ein rotes Öl aus, welches maßgeblich zur mythologischen Bedeutung der Pflanze beigetragen hat und die volkstümlichen Bezeichnungen um Namen wie z.B. Johannisblut, Blutkraut und Jesuswundenkraut erweitert hat.



Abbildung 1: *Hypericum perforatum* L.

2. Geschichte und Mythos

Schon Plinius der Ältere (23-79 n. Chr.) erwähnt in seiner „Historia Naturalis“ ein Kraut namens Hypereikon, welches Verbrennungen heilen soll (Umek et al. 1999). Ob es sich hierbei tatsächlich um Johanniskraut handelt oder um eine der vielen anderen Arten ist allerdings nicht bekannt. Etymologisch leitet sich der Gattungsname *Hypericum* wohl von den griechischen Begriffen „hyper“ = über und „eikon“ = Bild ab. Diese Bezeichnung gibt einen Hinweis, dass Pflanzen dieser Gattung als Apotropaikum verwendet wurden und zur Abwehr böser Geister über religiösen Bildern aufgehängt wurden. Schon in einer Salernitaner Drogenliste aus dem 13. Jahrhundert wird das Kraut mit den durchlöcherten Blättern als „herba daemonis fuga“ - Kraut, das den Teufel in die Flucht schlägt - bezeichnet. Der Volksmund hat daraus Namen wie Jageteufel, Teufelsflucht, Teufelsfuchtel, Walpurgiskraut oder Hexenkraut ersonnen. Die Kraft dazu wurde dem Johanniskraut aufgrund seiner sonnengelben Blütenblätter und sonnenstrahlen-ähnlichen Staubgefäße zugesprochen. Diese „Sonnenkraft“ vertreibe dunkle Gedanken und

Melancholie. Inwieweit diese Indikation, die dem heutigen Hauptanwendungsgebiet bei Depressionen quasi identisch ist, einen Zufall darstellt, kann nicht eindeutig geklärt werden. Ausreichende Wirkkonzentrationen sollten bei damals üblichen Tees und Auszügen selten erreicht worden sein. Dennoch traf die mystische Verehrung für bestimmte Pflanzen oft ins Schwarze. So zum Beispiel auch beim Ginkgo biloba, der in seiner asiatischen Heimat als heiliger Baum gilt, als ein Symbol für langes Leben, für Hoffnung, Siegeswillen und Lebenskraft. Heute werden Ginkgo-Extrakte erfolgreich als Nootropikum eingesetzt.

Die Bezeichnung Johanniskraut, engl. St. John's Wort, war bereits im 6. Jahrhundert in Irland bekannt. Sie entstand aus der Verehrung Johannes des Täufers, dessen Geburtstag am 24. Juni in die Hauptblütezeit der Pflanze fällt und deren rotes Öl symbolisch für das Blut des Märtyrers stand. Den botanischen Namen *Hypericum perforatum* etablierte schließlich der Systematiker und Taxonom Carl von Linné mit seinem 1753 erschienenen Werk „Species plantarum“.

Seither als traditionelles Beruhigungs- und Nervenmittel hauptsächlich in Tees verwendet, erlebt das Johanniskraut seit einigen Jahren einen enormen Aufschwung und entwickelt sich stetig weiter zum ernst zu nehmenden Antidepressivum. Auch andere traditionelle Anwendungen wie die wundheilungsfördernde Wirkung erleben derzeit eine Renaissance und werden intensiv erforscht.

3. Inhaltsstoffe

Johanniskraut zählt zu den bestuntersuchten Arzneipflanzen und weist ein breites Spektrum an bioaktiven Sekundärstoffen auf. Wie weit diese an der Gesamtwirkung beteiligt sind, wird noch diskutiert. Sie lassen sich in folgende Gruppen unterteilen:

3.1. Phloroglucinole

Das Phloroglucinolderivat Hyperforin [Abbildung 2] ist der Hauptinhaltsstoff der oberirdischen Pflanzenteile (Umek et al. 1999). Die höchsten Konzentrationen findet man in der Blüte und den Früchten, wo es hauptsächlich im Stempel akkumuliert wird (Repcák and Mártonfi 1997). Der Gehalt steigt von 2,5% in Blüten auf bis zu 8,5% in unreifen Früchten an (Tekel'ova et al. 2000). Dort dient es wahrscheinlich

als florales UV-Pigment und zum Schutz der Samen vor Herbivoren (Gronquist et al. 2001). In den Blättern ist es in den durchscheinenden schizogenen Ölbehältern lokalisiert [Abbildung 2] (Soelberg et al. 2007).

Auch Derivate wie z.B. das Furohyperforin und Adhyperforin wurden detektiert, jedoch in deutlich geringeren Mengen (F. Lang 2002, Verotta et al. 1999). Prenylierte Phloroglucinole sind instabil und oxidationsempfindlich. Unter den Angiospermen sind alkyl- und acylsubstituierte Phloroglucinol-Derivate weit verbreitet, ohne dass eine phylogenetische Verwandtschaft besteht. Sie sind von den Dryopteridaceae (*Dryopteris filix-mas*) bis zu den Cannabaceae (Humulone, Lupulone in *Humulus lupulus*) zu finden. Im Hopfen liegen die Phloroglucin-Derivate ähnlich wie in *Hypericum*-Arten prenyliert vor (Hänsel et al. 1999).

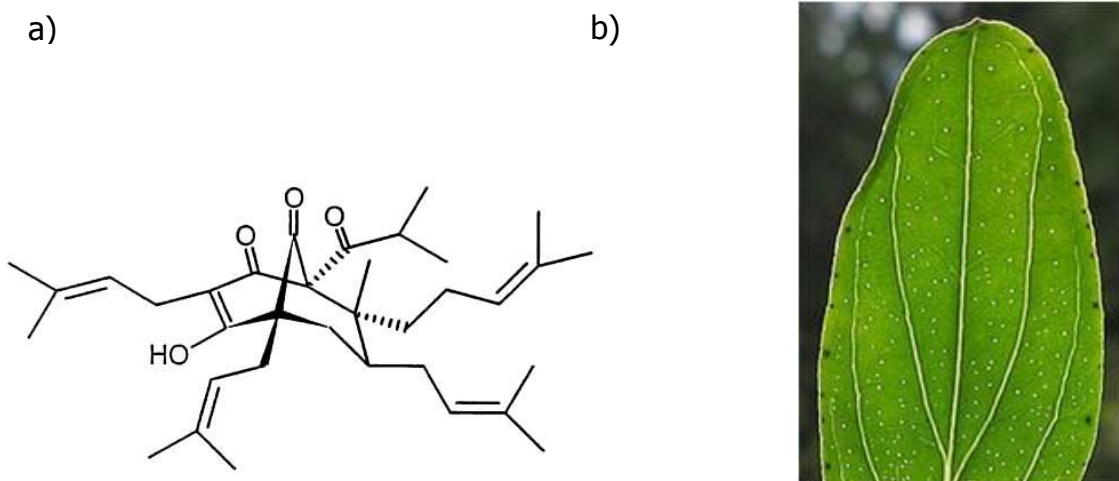


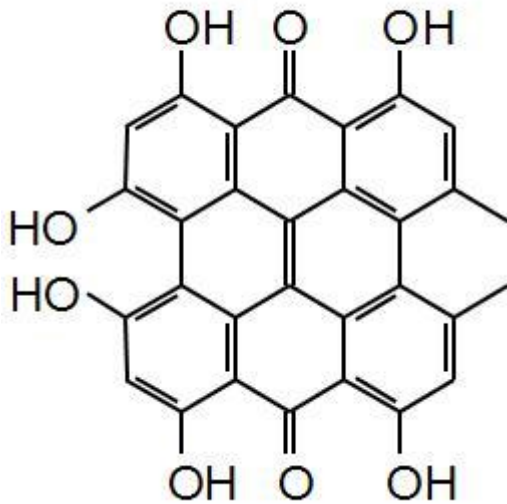
Abbildung 2: a) Hyperforin b) durchscheinende Ölbehälter im Blatt

3.2. Naphthodianthrone

Hypericin [Abbildung 3] und Pseudohypericin sind mit einem Gehalt von 0,1% bis 0,15% in der Pflanze vorhanden (Barnes et al. 2001). Man findet sie in den schwarzen Behältern am Blattrand und vor allem in den Blüten. Durch das konjugierte Doppelbindungssystem sind die Moleküle tiefrot gefärbt und geben dem aus Johanniskraut gewonnenen Rotöl den Namen. Lange Zeit galten die Hypericine als die Hauptwirksubstanzen von Johanniskraut-Zubereitungen. Diese These ist weitestgehend widerlegt, denn aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit und

problematischer Aufreinigung können definitive Aussagen über genaue Wirkmechanismen bislang nicht gemacht werden (Butterweck and Schmidt 2007).

a)



b)

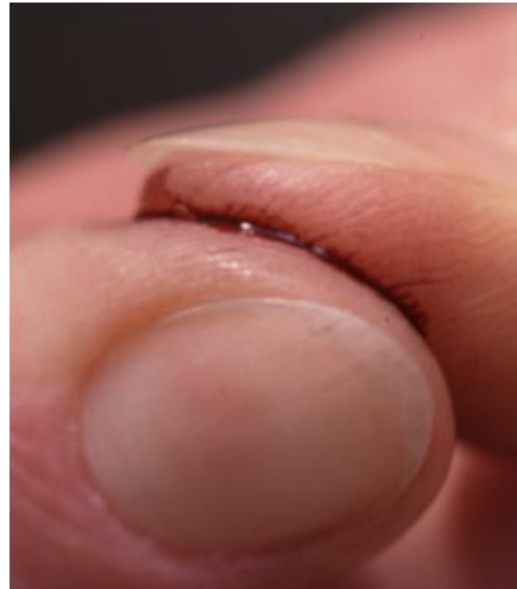


Abbildung 3: a) Hypericin und b) ausgequetschter roter Zellsaft

3.3. Flavonoide

Ein breites Spektrum an Flavonoiden ist mit einem Gesamtgehalt von 2%-4% enthalten. Darunter befinden sich hauptsächlich Quercetinglykoside wie Hyperosid, Rutosid und Quercetin, verschiedene Flavonoidaglykone und Biflavone wie Biapigenin und Amentoflavon (Hänsel et al. 1999) [Abbildung 4]. Sie geben den leuchtend gelben Blütenblättern ihre Farbe und dienen damit zum Anlocken von Bestäubern. Außerdem sollen sie eine Rolle bei der antidepressiven Aktivität des Gesamtextrakts spielen (Butterweck et al. 2000).

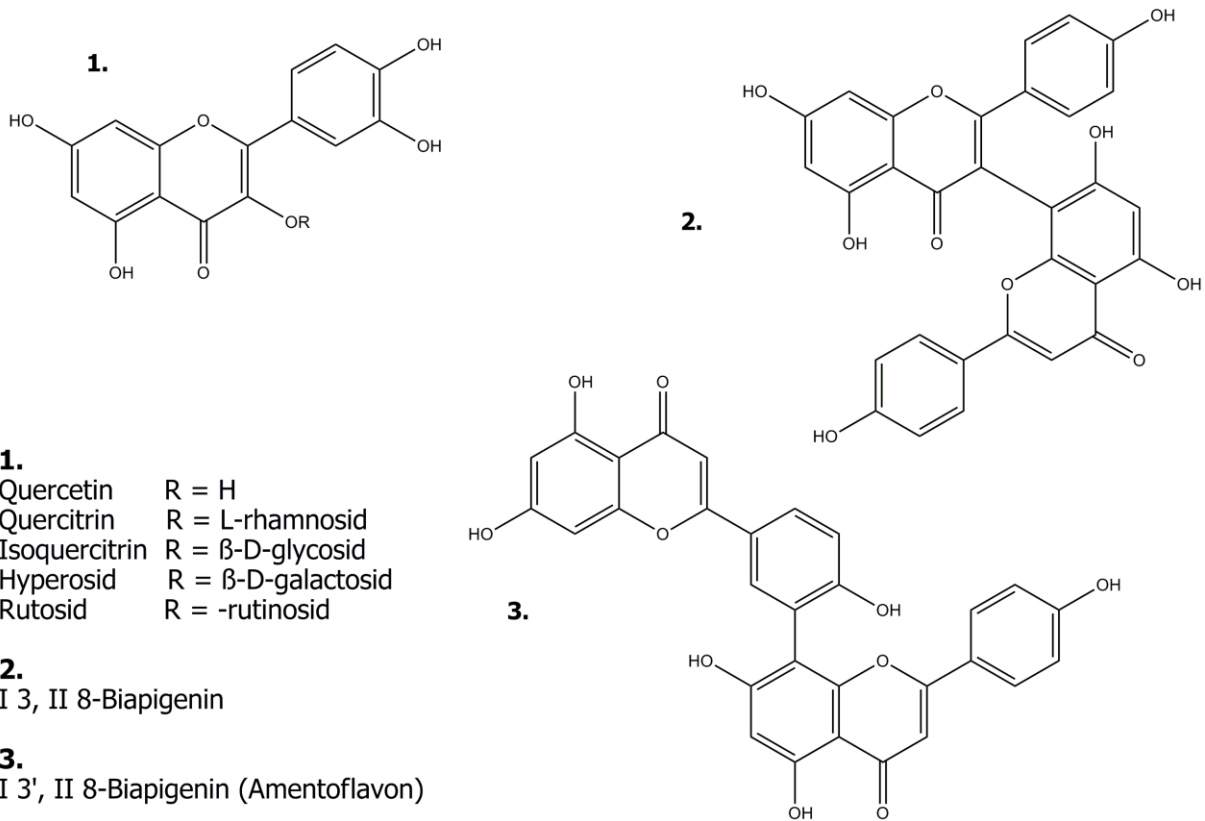


Abbildung 4: Flavonoide aus *Hypericum perforatum*

3.4. Weitere Inhaltsstoffe

Desweiteren kommen Procyanidine und Catechingerbstoffe mit einem Gehalt von 6%-15% vor. Xanthone wie das 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon wurden in oberirdischen Teilen in sehr geringen Mengen von 0,01% in der Pflanze gefunden [Abbildung 5], scheinen aber durch Stress induzierbar zu sein und dienen dann als Abwehrsubstanzen (Franklin et al. 2009). Außerdem findet man ätherisches Öl, Sterole und Phenolcarbonsäuren (Hänsel et al. 1999).

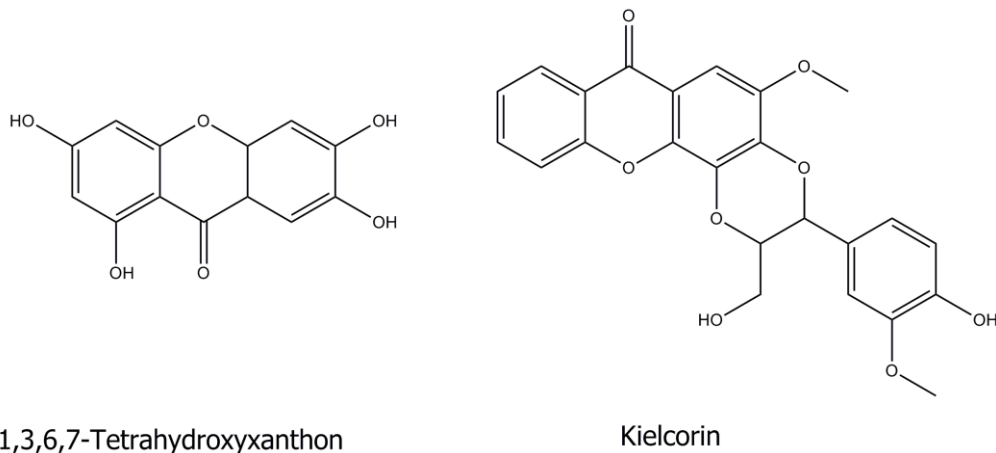


Abbildung 5: Xanthone aus *Hypericum perforatum*

4. Pharmakologie von Hyperforin

4.1. Antidepressive Wirksamkeit

Depressionen zählen zu den affektiven Störungen und gehören zu den häufigsten psychischen Erkrankungen. Sie sind gekennzeichnet durch eine den Lebensumständen nicht entsprechende psychische Verstimmung mit einer Hemmung der gesamten Affektivität. Dies unterscheidet Depressionen von Trauer, welche eine adäquate psychische Reaktion auf ein entsprechendes Ereignis darstellt. In einer Depression befindet sich der Patient in einem Zustand permanenter „Herabgestimmtheit“. Das Leben erscheint freud- und sinnlos. Der Antrieb ist gehemmt, so dass einfachste Aufgaben nicht mehr zu bewältigen sind. Hinzu kommt eine quälende innere Unruhe, Schlaf- und Appetitlosigkeit. Die Gedanken kreisen unentwegt um das eigene Befinden. Häufig äußern sich Depressionen auch in körperlichen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Herzschmerzen und so weiter. Man spricht dann von larvierten Depressionen (Mutschler et al. 2001).

Depressionen sind multifaktorielle Erkrankungen, die häufig im Zusammenhang mit anderen psychischen und internistischen Leiden auftreten. Leider werden sie häufig nicht diagnostiziert und therapiert, was dramatische Folgen haben kann.

Mittlerweile leidet ungefähr ein Viertel der erwachsenen Bevölkerung in den Industrienationen im Laufe des Lebens mindestens einmal unter einer Depression. Dabei erkranken Frauen doppelt so oft wie Männer. Es wird angenommen, dass mindestens zwei Drittel der in Deutschland begangenen Suizide auf Depressionen

zurückzuführen sind. Außerdem kommt es bei Depressiven dreimal häufiger zu krankheitsbedingtem Berufsausfall als bei Gesunden (Wittchen and Jacobi 2005). Laut einer Prognose der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden Depressionen bereits im Jahr 2020 die Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Volkskrankheit Nummer eins ablösen und sind daher dringend therapiebedürftig.

Die Ursachen für Depressionen sind mannigfaltig. So spielt eine genetische Prädisposition genauso eine Rolle wie permanenter Stress, Überlastung oder auch traumatische Erlebnisse.

Allen Depressionen ist ein gestörter Neurotransmitter-Stoffwechsel gemein, wobei besonders der Serotoninhaushalt verringert ist.

Hyperforin hemmt die synaptosomale Wiederaufnahme von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, Glutamat und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) (Chatterjee et al. 2001) [Abbildung 6]. Diese Breitbandwirkung hängt mit dem besonderen Wirkmechanismus zusammen. Durch Aktivierung nichtselektiver Kationenkanäle erhöht Hyperforin die intrazelluläre Natriumionenkonzentration und hemmt so den natriumgetriebenen Symport der Neurotransmitter ins Axon (Müller 2003, Treiber et al. 2005).

Es unterscheidet sich damit von synthetischen Antidepressiva, die meist direkt an den Neurotransmitter-Rezeptoren angreifen und die Transporter damit kompetitiv inhibieren, wie z. B. selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI). An diese Erhöhung der Neurotransmitter im synaptischen Spalt schließen sich Veränderungen der Rezeptordichte und -sensibilität der nachgeschalteten Zelle an.

In vielen randomisierten placebokontrollierten Doppelblindstudien wurde mittlerweile nachgewiesen, dass auf Hyperforin standardisierter Johanniskrautextrakt bei leichten bis mittelschweren Depressionen den synthetischen Antidepressiva ebenbürtig oder sogar überlegen ist (Gastpar et al. 2006, Brattström 2009, Szegedi et al. 2005, Kalb et al. 2001). Denn das Nebenwirkungsspektrum ist gering und bei hochdosierten Präparaten ist eine Tablette am Tag ausreichend. Das führt zu einer deutlich erhöhten compliance. Auch der Einsatz bei schweren Depressionen scheint mittlerweile gerechtfertigt (Kasper et al. 2006, Rahimi et al. 2009).

Trotz seiner Instabilität ist Hyperforin gut bioverfügbar und nach 2-6 Stunden wird der maximale Plasmaspiegel erreicht. Die Halbwertszeit bei Menschen beträgt 15

Stunden (Biber et al. 1998). Es wird eine Tagesdosis von 300-900 mg Gesamtextrakt empfohlen, wobei ähnlich zu synthetischen Antidepressiva mit einer Latenzzeit von 2-3 Wochen zu rechnen ist.

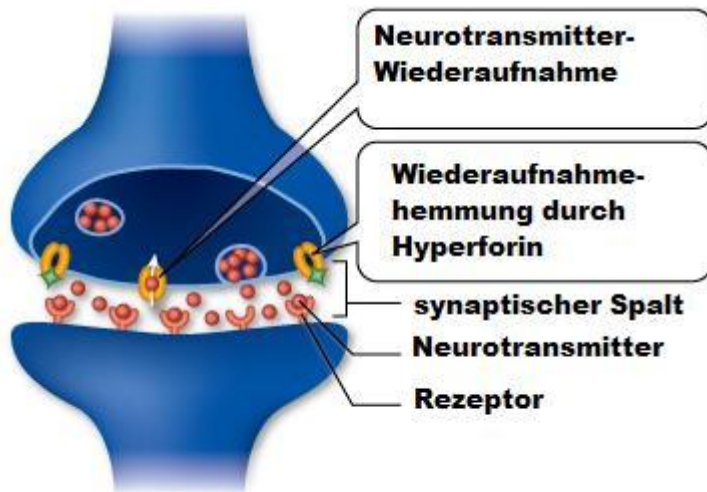


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Wiederaufnahmehemmung an der Synapse

4.2. Antibakterielle und entzündungshemmende Aktivität

Hyperforin zeigt eine ausgeprägte antibakterielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien, sogar gegen multiresistente *Staphylokokkus aureus*-Stämme (Reichling et al. 2001, Schempp et al. 1999). Desweiteren ist Hyperforin ein Hemmer der Zyklooxygenase 1 (COX-1) und der 5-Lipoxygenase, wodurch die Bildung von Entzündungsmediatoren eingeschränkt wird (Albert et al. 2002). Diese Eigenschaften erklären auch die traditionelle Verwendung bei Brandwunden und Verletzungen. Außerdem zeigt die Verwendung bei entzündlichen Hautkrankheiten wie dem atopischen Ekzem großen Erfolg (Schempp et al. 2003).

4.3. Antitumorale Wirksamkeit

Neuere Forschungen haben gezeigt, dass Hyperforin ein vielversprechendes Potential besitzt, bald auch als Krebstherapeutikum eingesetzt zu werden. Durch Induktion von Apoptose hemmt es viele Tumorzelllinien bei Menschen und Ratten bei mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) von 3-20 µM (Hostanska et al. 2003, Schempp

et al. 2002). *In vivo* beobachtet man einen dem Paclitaxel ähnlichen Effekt, wobei jedoch keine Zeichen von akuter Toxizität auftreten (Schempp et al. 2002). Auch ein synthetisches Derivat, das Aristoforin, welches über bessere Stabilität und Wasserlöslichkeit verfügt, behielt die antitumoralen Eigenschaften der Muttersubstanz bei (Gartner et al. 2005).

4.4. Enzyminduktion

Neben den genannten Wirkprinzipien, die Hyperforin zum therapeutischen Einsatz qualifizieren, verfügt es aber auch über starke enzyminduzierende Aktivität. Es aktiviert den Pregnan X Rezeptor (PXR), was zur verstärkten Expression der Monooxygenase CYP3A4 führt. Dieses Phase-I-Biotransformationsenzym ist für die hepatische Oxidation von über 50% der meistverwendeten Arzneistoffe verantwortlich (Moore et al. 2000). Dadurch kann es bei gleichzeitiger Gabe zu starker Senkung oder - bei Gabe von Prodrugs - Erhöhung des Blutspiegels des anderen Arzneistoffs kommen. Diese Interaktion kann im Falle von Immunsuppressiva, HIV-Protease Inhibitoren und Krebsmedikamenten lebensgefährliche Konsequenzen haben (Ruschitzka et al. 2000). Allerdings scheint Hyperforin auch die Aktivität von CYP3A4 auf Enzymebene zu inhibieren (Lee et al. 2006, Obach 2000), wodurch der expressionsfördernde Effekt weniger stark ins Gewicht fallen würde. Außerdem beeinflusst Hyperforin auch Expression und Aktivität des zur Familie der ABC-Transporter gehörenden P-Glykoproteins (Gutmann et al. 2006, Wang et al. 2004, Wang et al. 2001, Weber et al. 2004).

5. Biosynthese

Die Biosynthese von Hyperforin ist weitestgehend unaufgeklärt. Erst wenige Schritte sind bekannt. Durch Fütterungsversuche mit ^{13}C -markierter Glukose bzw. Valin und anschließender NMR Analyse konnte gezeigt werden, dass das Phloroglucin-Grundgerüst aus dem Polyketidstoffwechsel entsteht, wobei das aus Valin gebildete Isobutyryl-CoA als Startersubstrat fungiert (Adam et al. 2002, Karppinen et al. 2007). Es kondensiert mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu einem linearen Intermediat, welches durch intramolekulare Claisen-Kondensation zum Phlorisobutyrophenon

umgesetzt wird. Dieser Schritt konnte in Zellkulturen von *Hypericum calycinum* nachgewiesen werden (Klingauf et al. 2005). Das katalysierende Enzym ist die Isobutyrophenon-Synthase (BUS), eine Typ III Polyketidsynthase. Sie wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie von der Benzophenon-Synthase (BPS) und der Chalkonsynthase (CHS) getrennt, welche zur gleichen Enzymklasse gehören. Aus Benzoyl-CoA und 4-Cumaryl-CoA bilden sie mit drei Molekülen Malonyl-CoA nach dem gleichen Prinzip Phlorbenzophenon bzw. Naringenin-Chalkon, die Grundkörper der Xanthone beziehungsweise Flavonoide (Liu et al. 2003) [Abbildung 7].

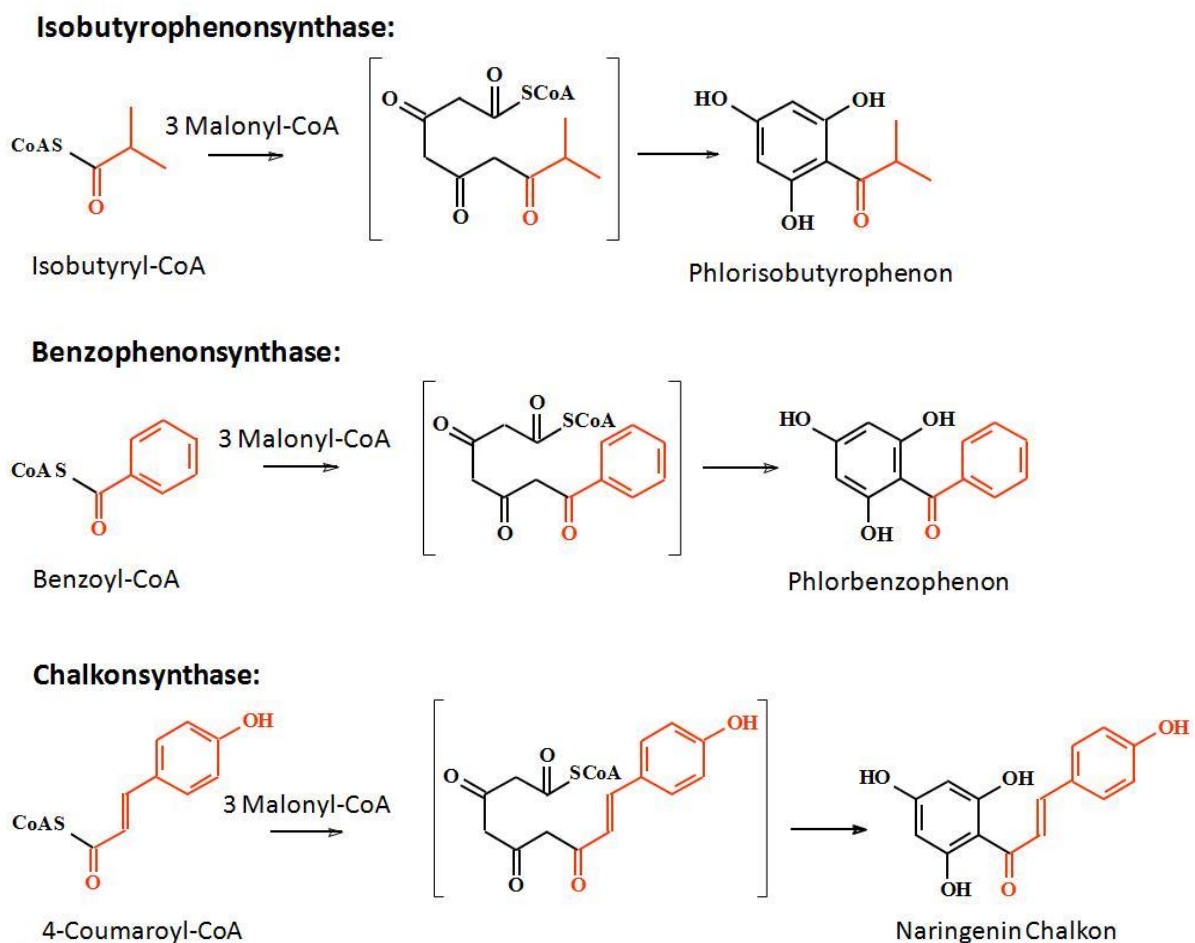


Abbildung 7: Reaktionen von Polyketidsynthasen aus Johanniskraut

Die fünf Isopreneinheiten zur anschließenden Prenylierung werden hauptsächlich in Plastiden durch den Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg) gebildet (Adam et al. 2002). Der erste Prenylierungsschritt konnte in Zellkulturen von *H. calycinum* detektiert werden [Abbildung 8]. Das beteiligte Enzym ist löslich und in seiner Aktivität abhängig von zweiwertigen Kationen, vorzugsweise Fe^{2+} (Boubakir et al.

2005). Alle weiteren Schritte sind bislang unaufgeklärt. Ebenso ist es noch nicht gelungen, die Gene der bekannten Enzyme zu klonieren und heterolog zu exprimieren.

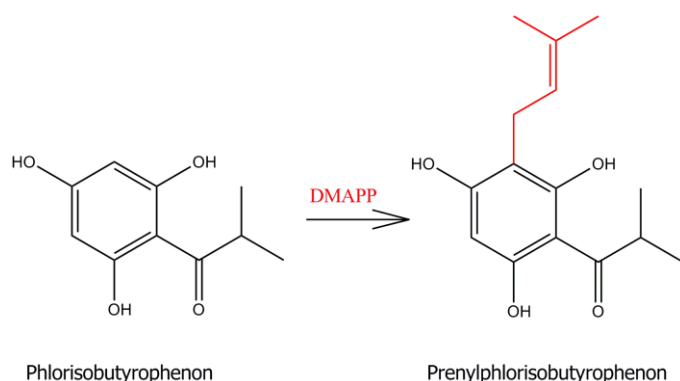


Abbildung 8: Erster Prenylierungsschritt der Hyperforin-Biosynthese

6. Ziel der Arbeit

Angesichts der vielfältigen Forschungsarbeit über die Einsatzgebiete von Johanniskrautzubereitungen und der fundierten Wirksamkeitsbelege für Hyperforin, fällt es ins Auge, dass die Biosynthese dieser potenten Verbindung weitestgehend unaufgeklärt ist und sich gerade im Bezug auf die Prenylierungsschritte sehr auf Vermutungen und Hypothesen stützt. Auch eine chemische Synthese ist aufgrund der Komplexität des Bicyklus und seiner Chiralität noch nicht gelungen (K. C. Nicolaou et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, Gene beteiligter Prenyltransferasen zu identifizieren, kodierende cDNAs zu klonieren und die Enzyme heterolog zu exprimieren. Denn erst durch eine anschließende Charakterisierung der rekombinanten Enzyme kann eindeutig geklärt werden, wie die Biosynthese abläuft. Mit diesem Wissen könnte Hyperforin in Zukunft auch in transgenen Mikroorganismen erzeugt werden, um der steigenden Nachfrage gerecht zu werden. Außerdem könnten auf diesem gentechnischen Weg auch Derivate erzeugt werden, die günstigere Eigenschaften in Bezug auf Stabilität, Wirkspektrum und Nebenwirkungen aufweisen könnten.

II. Material

1. Biologisches Material

1.1. Pflanzenmaterial

Pflanzen von *Hypericum perforatum* und *Hypericum calycinum* wurden im Arzneipflanzengarten des Instituts für Pharmazeutische Biologie gesammelt. Blätter, Knospen, Wurzeln, Rhizome, Stängel und Früchte wurden getrennt in flüssigem Stickstoff eingefroren und direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert.

1.2. Zell- und Gewebekulturen

Zellsuspensionskulturen von *Hypericum perforatum* L. und *Hypericum calycinum* L. waren in der Arbeitsgruppe bereits etabliert [Abbildung 9]. Sie wurden in 250 ml-Erlenmeyerkolben, die 50 ml LS-Medium enthielten, kultiviert. Die Anzucht erfolgte im Dunkeln bei 25 °C auf Rotationsschüttlern (180 U/min). Alle zehn Tage wurden die Zellen durch Verteilen des Kolbeninhalts auf zwei Kolben mit frischem Medium überimpft. Für Untersuchungen benötigtes Zellmaterial wurde durch Vakuumfiltration vom Medium getrennt und bei -80 °C gelagert oder sofort aufgeschlossen. Sprosskulturen von *H. perforatum* wurden nach Charchoglyan et al. (2007) kultiviert.



Abbildung 9: Zellkultur von *H. calycinum*

1.3. Bakterien und Plasmide

1.3.1. Bakterienstämme

<i>E.coli</i>	Relevante Eigenschaften
DH5α	<i>F' φ80δlacZ9M15 end A1 hsdR17(rk-mk+)supE44 thi-1 λ-gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argFV169) deoR</i>

1.3.2. Plasmidvektoren

Vektor	
pGEM [®] -T easy	Promega
pBluescript SK+	Stratagene

1.3.3. Bacterial Artificial Chromosome (BAC)

Eine BAC-Datenbank mit dem Genom von *Hypericum perforatum* wurde mit einem Fragment der Prenyltransferase cDNA gescreent und ein positiver Klon mit ca. 5 kb Insert im pBluescript SK+-Vektor vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

1.4. Enzyme

Enzyme		
DNA-Synthese	Taq-Dna Polymerase	Fermentas
	omni <i>taq</i> -OLS [®] -DNA-Polymerase	OMNI Life Science
	RevertAid [™] H Minus M-MuLV RT	Fermentas

	PowerScript™ RT	Clontech
	Terminale Transferase	Fermentas
	PrimeScript™ RTase	TaKaRa
Restriktion	EcoRI, EcoRV	Fermentas
weitere Enzyme	T4-DNA-Ligase	Fermentas
	RNase A, RNase H	Fermentas

2. Nukleinsäuren und Nukleotide

2.1. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) im Auftrag synthetisiert und bezogen.

Die verwendeten 3' CDS- und 5' CDS-Primer besitzen durch zwei variable Basen in der Position direkt hinter dem Oligo(dT)(N-1N) eine höhere Spezifität, um mit dem Anfang des poly(A)-Restes der mRNA zu hybridisieren (Liang and Pardee 1992).

2.1.1. Degenerierte Oligonukleotide

Sense1 DXXD	5' - ATI AA(CT) GA(CT) T(AT)(CT) (GT)(CT)I GA(CT) (AC)G - 3'
Sense2 DKPIG(ST)W	5' - GA(CT) AA(AG) CCI AT(ACT) GGI (AT)(GC)I TGG - 3'
Antisense1 DTIYAHQ	5'- TT(AG) TC(CT) TG(AG) TGI GC(AG) TA(AGT) ATI GT(AG) TC - 3'

2.1.2. Genspezifische Oligonukleotide

Primer für Prenyltransferase	
Pren AS 1	5' - CAG CAT AGA GCG GCA GTA TAA CAG - 3'
Pren AS 2	5' - TGC AGA CCA GCC TAA TAA AG - 3'

Material

Pren AS 4	5' - GTC CAA AAC ACT CCA CCA GCA TA - 3'
Pren AS 5	5' - GAG AAG AAT ACC AAG ACC CAA GAC C - 3'
Pren AS 6	5' - CTT GTT CGC TCC ACC TTT CTA TCG - 3'
Pren AS 6,5	5' - CAG CGA AAT CGA CCA CAT ACA GG - 3'
Pren AS 7	5' - ATC CAC GTC AGC TCC ACT TGC - 3'
Pren S 1	5' - CTT GGG TCT TGG TAT TCT TCT CC - 3'
Pren S 2	5' - CTC AAG CCT ATC TTG GTC TCA - 3'
Pren S 3	5' - GCT TTA TTA GGC TGG TCT G - 3'
Pren S 4	5' - TAC TGC CGC TCT ATG CTG GTG - 3'
Pren S 5	5' - AGT ACG CGG GGC TAA AGT TGT CG - 3'
Pren Rev 1	5' - GCA AAT CGA CCA CAT ACA GGG CCA AGC - 3'
Pren Rev 2	5' - GAT CCA CGT ACG CTC CAC TTG CTT CTC C - 3'
Pren Rev 3	5' - TCC TCC GAT CCC GTT AAA GTC GAC AAC -3'

Actin Primer

for Actin	5' - AGA TGA CCC AGA TCA TGT TCG - 3'
rev Actin	5' - AGC TCG TAG CTC TTC TCG AC - 3'

Sitefinding Primer

SFP 1	5' - CAC GAC ACG CTA CTC AAC AC - 3'
SFP 2	5' - ACT CAA CAC ACC ACC TCG CAC AGC - 3'
SiteFinder NcoI	5' - CAC GAC ACG CTC AAC ACA CCA CCT CGC ACA GCG TCC TCA ACC ATG GII III IGC CT - 3'

Smart II RACE Primer /5' RACE Primer

SMART II	5' - AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG- 3'
3' CDS	5' - AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C(T) ₃₀ N ₁ N- 3'
5' CDS	5' - (T) ₂₅ N ₁ N- 3'
RACE-Short	5' - CTA ATA CGA CTC ACT ATA AGG GC- 3'
RACE-Nested	5' - AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT- 3'
RACE-Long	5' - CTA ATA CGA CTC ACT ATA AGG GCA AGC AGT GGT AAC AAC GCA GAG T- 3'
AAP	5' - GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG -3'
AUAP	5' - GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'

Vektorspezifische Primer	
T7	5' - GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG- 3'
SP6	5' - GAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC- 3'
T3	5' - ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA -3'

TATA Box Primer	
TD Tata	5'- GAT TCT AGA (CT)(CT)I CTA TA(AT) A(AT)A (GC)(AC) - 3'

3. Kits für die Molekularbiologie

Kits für die Molekularbiologie		
RNA-Isolierung	illustra QuickPrep™ Micro	GE Healthcare
	mRNA Purification Kit	GE Healthcare
DNA-Isolierung	NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel
	NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
	DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
Sequenzierung	BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems

4. Chemikalien, Reagenzien , Kulturmedien, Lösungen und Puffer

4.1. Chemikalien und Reagenzien

Reagenzien für Biochemie und Molekularbiologie	
DMSO	(Fluka)
IPTG	(Sigma Aldrich)
X-Gal	(Sigma Aldrich)
ATP	(Sigma Aldrich)
dNTPs	(Fermentas)

Material

dThymin	(Fermentas)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerasepuffer	(Fermentas)
Imidazol	(Roth)
Polyclar AT	(Serva)
NaH ₂ PO ₄	(Roth)
Na ₂ HPO ₄	(Roth)
Isopropanol	(Roth)
Ethanol	(Roth)
Chloroform	(Roth)
Isoamylalkohol	(Roth)

Reagenzien für die Gelelektrophorese

Agarose NEEO-Ultra	(Roth)
Ethidiumbromid	(Roth)
Harnstoff	(Bio-Rad)
TEMED	(Bio-Rad)
Acrylamid/ Bisacrylamid 30%	(Bio-Rad)
Ammoniumpersulfat	(Roth)
EDTA	(Sigma Aldrich)
Formamid	(Sigma Aldrich)
Tris	(Roth)

4.2. Kulturmedien

Alle Medien wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und der pH-Wert mit Natronlauge oder Salzsäure eingestellt. Die Sterilisation erfolgte im Autoklaven für 20 min bei 121 °C und einem Druck von 2 bar. Temperaturempfindliche Bestandteile (z.B. Antibiotika) wurden sterilfiltriert und dem Medium nachträglich zugegeben.

4.2.1. Kulturmedien für Pflanzenzellkulturen

LS Medium (Linsmaier and Skoog 1965)		
NH ₄ NO ₃	1650	mg/l
KNO ₃	1900	mg/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370	mg/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440	mg/l
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	41,3	mg/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8	mg/l
H ₃ BO ₃	6,2	mg/l
MnSO ₄ x H ₂ O	16,9	mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10,6	mg/l
KJ	0,83	mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25	mg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025	mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025	mg/l
Myo-Inosit	100	mg/l
Thiaminchlorid-HCl	10	mg/l
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	0,9	mg/l
1-Naphtylessigsäure	1,04	mg/l
Saccharose	30	mg/l

4.2.2. Kulturmedien für Bakterienkulturen

LB-Medium (Sambrook and MacCallum 2001a)

Pepton aus Casein	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH 7,0- 7,2	
Festmedium: 1,5% Agar	

SOC- Medium

Pepton aus Casein	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
1 M NaCl	10 ml/l
1M KCl	2,5 ml/l
nach dem Autoklavieren hinzufügen:	
2 M Mg ²⁺ Stammlösung	10 ml/l
2M Glukose	10 ml/l
dH ₂ O	ad 100 ml

2M Mg²⁺ Stammlösung

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	20,33 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	24,56 g
dH ₂ O	ad 100 ml

4.3. Lösungen und Puffer

4.3.1. Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese

Puffer zur DNA-Auftrennung		
6x Gel-Ladepuffer:	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanoblau	0,25% (w/v)
	Glycerol	30% (w/v)
	EDTA	10 mM
50x TAE-Puffer:	Tris	2 M
	EDTA	0,05 M
	Mit Eisessig auf pH 8 einstellen	
TBE-Puffer	Tris	90 mM
	Borsäure	90 mM
	EDTA	2 mM
Ladepuffer zum Sequenzieren:	25mM EDTA	1 ml
	Formamid	5 ml
	Dextranblau	0,1 mg
Sequenziergel:	Harnstoff	9 g
	10x TBE-Puffer	3 ml
	dH ₂ O	11,5 ml
	30% Acrylamid	3,75 ml
	TEMED	10 µl
	10% (w/v) APS	230 µl

4.3.2. Puffer zur Plasmidisolierung

Puffer P1:	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	pH 8	
	Vor Gebrauch dazugeben:	
	RNase A	100 µg/ml
Puffer P2:	NaOH	0,2 M
	SDS	1% (w/v)
Puffer P3:	Kaliumacetat	2,55 M
	pH 5,5	
TE-Puffer:	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH 8	

4.3.3. Puffer und Reagenzien zur RNA Isolierung

Extraktionspuffer:	CTAB	
	(Hexadekyltrimethylammoniumbromid)	2%
	PVP (Polyvinylpyrrolidon)	2%
	Tris- HCl (pH 8.0),	100mM
	EDTA	25mM
	NaCl	2 M
	Spermidin	0,5g/l
autoklavieren, dann hinzugeben:		

Material

	B-Mercaptoethanol	2%
	Chloroform/Isoamylalkohol	24:1
	LiCl	10 M
SSTE	NaCl	1 M
	SDS	0,5%
	Tris-HCl (pH 8)	10 mM
	EDTA (pH 8)	1 mM

4.3.4. Sonstige Lösungen

IPTG-Lösung	IPTG	6 g
	dH ₂ O	ad 500 ml
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid	100 mg
	N,N'-Dimethylformamid	2 ml
Bradford-Reagenz	Coomassie-Brilliantblau G250	100 mg
	Ethanol 96 %	50 ml
	Phosphorsäure 85 %	100 ml
	dH ₂ O	ad 1000 ml

5. Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Vapoklav	Sterico
Elektrophorese	Sub Cell- GT	Bio-Rad
	Mini-Sub-Cell	Bio-Rad
Geldokumentation	MultiImage™ Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
HPLC- Analytik	1525 Binary HPLC Pump	Waters
	2487 Dual λ Absorbance Detector	Waters
PCR- Cycler	T-Professional Gradient	Biometra
Photometer	UV- Mini 1240	Shimadzu
pH- Meter	pH 325	WTW
Reinstluft	LiminAir HLB 2472	Heraeus
Reinstwasser	Arium 611	Heraeus
Rotationsverdampfer	Laborota 4000-efficient	Heidolph
Schüttler	HAT	Infors
Sequenzierer	ABI Prism 377	Applied Biosystems
Spannungsgeber	Power Pac 300	Bio-Rad
Temperierung	Dri-Block DB 3D	Techne
	Exatherm U3	Julabo
	Wasserbad	Köttermann
Vakuumkonzentrator	Genevac SF50	Biometra
Waagen	Analysen- und Feinwagen	Satorius
Zentrifugen	Universal 32 R	Hettich
	Biofuge 13	Heraeus

III. Methoden

1. Methoden der Biochemie

1.1. Zellfreie Extrakte aus Pflanzenmaterial

Zellfreie Proteinextrakte wurden aus Sprosskulturen von *Hypericum perforatum* L. gewonnen. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Von drei Wochen alten Sprosskulturen wurde 1 g mit 100 mg Polyklar® AT versetzt, um phenolische Verbindungen abzutrennen, die unerwünschte Interaktionen mit Proteinen eingehen können. Dieses Gemisch wurde in 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer (pH 6,5; 1 mM DTT) mit Seesand in einem Mörser homogenisiert. Die erhaltene Masse wurde bei 9.000 rpm für 20 min unter Kühlung zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Abtrennung von niedermolekularen Verbindungen auf eine PD10 Säule gegeben und mit 3,5 ml 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,5, 1 mM DTT) eluiert. Das Eluat wurde zur Proteinbestimmung und für Inkubationen eingesetzt.

1.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt einer Lösung wurde nach der Methode von (Bradford 1976) bestimmt. Dabei verschiebt sich in sauren Lösungen das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brillantblau G250 in Gegenwart von Proteinen von 465 nm auf 595 nm. Dieser Effekt ist nur begrenzt linear an einen Konzentrationsbereich gekoppelt. Eine Kalibrierung mit BSA als Standard wurde durchgeführt. Für die Messung unbekannter Proteingehalte wurde eine der Kalibrierung entsprechende Menge der zu vermessenden Lösung mit Reinstwasser auf 100 µl aufgefüllt und mit 900 µl Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm vermessen und der Gehalt anhand der Kalibrierung ermittelt.

1.3. Enzyminkubation

Alle Bestandteile eines Inkubationsansatzes [III.1.3.1.] wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 37 °C für 30 min inkubiert. Eine Probe mit denaturiertem Enzym diente als negative Kontrolle. Dazu wurde die Enzymlösung vor Zugabe der restlichen

Reaktionsbestandteile 10 min gekocht. Nach Inkubation wurde der Enzymansatz zwei Mal mit 500 µl Ethylacetat extrahiert und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erzielen. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden im Vakuum eingengt. Für die HPLC-Analyse [III.2.2] wurde der Rückstand in 50 µl Methanol aufgenommen.

1.3.1. Inkubationsansatz

	Stammlösung	Volumen [µl]	Endkonzentration
Phlorisobutyrophenon	0.1 M	2,5	1 mM
DMAPP	50 mM	10	2 mM
FeCl ₂	0,1 M	25	10 mM
Enzymextrakt	Rohextrakt	50	
Tris-HCl (pH 7,5)		ad 250	

2. Instrumentelle Analytik

2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die DC-Überprüfung der Synthesefraktionen [III.3.2] wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien verwendet (Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm; Merck, Darmstadt). Die Fraktionen wurden mit einer Glaskapillare auf die Platte aufgetragen und in einer DC-Kammer chromatographiert. Die mobile Phase setzte sich aus n-Propanol-Ammoniak (konz.)-Wasser (6:3:1) zusammen. Nach Besprühen mit Eisen(III)-Chlorid-Sulfosalicylsäure erfolgte die Detektion unter UV Licht. Phosphatgruppen enthaltende Fraktionen erschienen als weiße Punkte auf violetterem Hintergrund.

2.2. High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie dient der Auftrennung von Substanzgemischen im µg-ng Maßstab. Die Trennung erfolgt an einer stationären Phase durch Adsorptionsvorgänge. Eine flüssige mobile Phase eluiert die Analyten

von der Trennsäule in Abhängigkeit von der Elutionskraft der mobilen Phase einerseits und der Stärke der Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase andererseits. Für die durchgeführten Chromatographien wurde als stationäre Phase eine C₁₈-Umkehrphasen-Säule verwendet. Als Eluenten wurden Methanol und bidestilliertes Wasser (0,1% v/v H₃PO₄) im Gradientenprogramm eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Spektroskopie.

2.2.1. Instrumentierung

Pumpe: Waters 1525 Binary HPLC Pump

Detektor: Waters 2487

Software: Waters Breeze GPC

Säule: Nukleosil C₁₈ 100-5 (25 x 0,4 cm); Fa. Macherey & Nagel

2.2.2. Gradientenprogramm

Die Flussrate betrug 0,5ml/min.

Zeit [min]	Methanol [%]	Wasser [%]	Detektion [nm]
0	50	50	291
5	50	50	
20	100	0	
25	100	0	
27	50	50	
30	50	50	

3. Synthese und Aufreinigung von Dimethylallylpyrophosphat

3.1. Synthese

DMAPP wurde nach der von (Holloway and Popjak 1967) modifizierten Methode von (F. Cramer 1959) synthetisiert. In 20 ml Acetonitril gelöstes Di-Triethylammoniumphosphat (14,4 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre langsam durch einen Tropftrichter zu Trichloracetonitril (36 mmol) und 3,3-Dimethylallylalkohol (6 mmol) gefügt. Die Tropfrate betrug etwa 2 Tropfen/ min. Die Reaktion wurde für 4 Stunden unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch in 100 ml Diethylether gelöst und in einem Scheidetrichter drei Mal mit 0,1 N Ammoniaklösung ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden in einem Rotationsverdampfer bei 50°C auf ca. 2 ml eingengt.

3.2. Aufreinigung des Synthese-Gemisches

Um das gewünschte Produkt von Monophosphat und anderen Nebenprodukten zu trennen wurde das eingengte Reaktionskonzentrat auf eine mit n-Propanol-Ammoniak (konz.)-Wasser (6:3:1) äquilibrierte Kieselgelsäule (60 cm x 1,3 cm, Kieselgel 60, 0,063-0,200 mm; Fa. VWR International) gegeben. Es wurden mit dem gleichen Fließmittelgemisch Fraktionen zu 3 ml eluiert. Nach Überprüfung auf DMAPP mittels DC [III.2.1] wurden die Fraktionen 35-44 im Rotationsverdampfer auf wenige ml eingengt, mit Ammoniak alkalisiert und gefriergetrocknet.

4. Methoden der Molekularbiologie

4.1. Kultivierung von *E. coli*

Der verwendete *E. coli* -Stamm [II.1.3.1] wurde als Dauerkultur bei -80 °C in einer Mischung von Glycerin (20%) und LB-Medium gelagert. Zur Aufzucht und Transformation wurden Aliquote dieser Kulturen auf festem LB-Medium ausplattiert und einzelne Kolonien weiter verwendet. Die Aufzucht bereits kompetenter Zellen erfolgte nach Transformation zunächst auf SOC-Medium. Für Übernachtskulturen wurden die transformierten Bakterien auf festem LB-Medium mit entsprechenden Selektionsantibiotika ausgestrichen und einzelne Kolonien weiter in 5 ml flüssigem LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Diese Kulturen wurden für die Plasmidisolierung eingesetzt. Transformierte *E. coli* -Kolonien konnten auf festem LB-Medium mit Selektionsantibiotikum bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

4.2. Herstellung kompetenter *E. coli*

Die beschriebenen Bakterienstämme [II.1.3.1] wurden nach der Calciumchlorid-Methode für die Transformation kompetent gemacht (Mandel and Higa 1970). Von einer ausplattierten Dauerkultur wurde eine Kolonie über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen und von dieser 1 ml in 50 ml frisches Medium überführt. Bei einer Konzentration von OD₆₀₀ 0,6-0,8 wurden die Bakterien in einem Falcon-Röhrchen bei 3.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und mit 50 ml einer eiskalten 0,05 M CaCl₂-Lösung gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert, das Pellet in 20 ml der CaCl₂-Lösung resuspendiert und die Lösung weitere 20 min auf Eis gehalten. Es wurde wieder zentrifugiert und das Pellet in 940 µl 0,05 M CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden der Lösung 140 µl Glycerin hinzugesetzt, die Mischung in 50 µl-Aliquote aufgeteilt und diese bei -80 °C bis zur Transformation gelagert.

4.3. Design von Oligonukleotiden

Oligonukleotide als Primer für die cDNA-Synthese und für die PCR wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die Primer wiesen eine Länge von 18-25 Nukleotiden auf und wurden so gewählt, dass die Schmelztemperatur

möglichst bei 55-65 °C und der GC-Gehalt bei 45-55 % lagen. Primer für die Fragmentsuche waren entweder durch Mischbasen oder Inosin degeneriert. Mischbasen werden durch anteiliges Vorkommen der Nukleotide bei der Synthese eingeführt und sind in Klammern dargestellt [II.2.1.1]. Inosin wird eingesetzt, um mit A, C, G oder T zu hybridisieren (Case-Green and Southern 1994). Der Vorteil von Inosin liegt im resultierenden niedrigeren Degenerationsgrad der Primer. Dieser berechnet sich durch die Anzahl der möglichen Basen in einer degenerierten Position. Alle Werte für diese Positionen eines Primers werden miteinander multipliziert. Der Degenerationsgrad sollte 512 nicht überschreiten. Inosin erhält den Faktor 1.

4.4. Isolierung von RNA

4.4.1. Isolierung von poly (A⁺)-RNA

Poly(A⁺)-RNA zur Synthese von cDNA wurde aus Pflanzenteilen von *H. perforatum* und *H. calycinum* sowie aus Zellkulturen der beiden Pflanzen gewonnen. Dazu wurde das Material in flüssigem Stickstoff gemörsert. Aus 100 mg des feinen Pulvers wurde mit Hilfe des illustra QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kits [II.3] mRNA gewonnen. Diese Methode beruht auf Tensidlyse des Zellmaterials und Adsorption der mRNA an eine Cellulose-oligo(dT)-Affinitätsmatrix. RNasen werden dabei durch Guanidiniumthiocyanat inhibiert. An die Matrix gebundene poly(A⁺)-RNA wird nacheinander mit hoch und niedrig konzentrierten Puffern gewaschen und schließlich eluiert. Die so gewonnene poly(A⁺)-RNA wurde direkt für die reverse Transkription verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

4.4.2. Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von gesamt-RNA wurde sowohl aus Suspensionskulturen als auch aus nativem Pflanzenmaterial mit Hilfe des NucleoSpin RNA Plant Kits [II.3] durchgeführt. Dazu wurde Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen. 100 mg des Pulvers wurden in Extraktionspuffer gelöst, durch Filtration von zellulären Bestandteilen befreit und an eine Kieselgelmatrix adsorbiert. Nach Verdau von DNA durch DNase I wurde die RNA auf der Matrix

gewaschen und abschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die gewonnene gesamt-RNA wurde direkt für die reverse Transkription eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

4.4.3. Isolierung von Gesamt-RNA bei sekundärstoffreichen Pflanzenproben

Da frische Pflanzenteile von *H. perforatum* viele Sekundärstoffe enthalten, die bei der RNA-Isolierung stören können beziehungsweise die RNA schneller degradieren lassen, beschreiben (Jaakola et al. 2001) eine modifizierte Methode nach (Chang et al. 1993) [II.4.3.3], bei der durch Nutzung von CTAB im Extraktionspuffer Polysaccharide von Nukleinsäuren getrennt werden und durch Zusatz von PVP und β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel die Oxidation phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe verhindert wird. Mit dieser Methode ließ sich qualitativ sehr hochwertige RNA aus Knospen, Früchten und Blättern gewinnen. Außerdem wurden 10 mal 100mg der gleichen Probe parallel extrahiert und im letzten Schritt vereinigt und präzipitiert. Isoliert man RNA mit handelsüblichen Kits, sind 100 mg eingesetztes Pflanzenmaterial die maximale Menge, da sonst die Kapazität der Kieselgelmatrix überschritten wird. Durch ein geringes Lösevolumen, ließ sich Menge der enthaltenen RNA deutlich erhöhen. Damit wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die erforderliche Mindestmenge an gewünschtem Ausgangstranskript vorhanden war.

4.5. Reverse Transkription

4.5.1. cDNA-Synthese mittels SMART-RACE-Verfahren

Die unter [III.4.4] gewonnene RNA wurde für die Erststrang-cDNA-Synthese verwendet. Beim SMART-RACE (Rapid amplification of cDNA ends)-Verfahren wird die neu gebildete cDNA durch PowerScript™ RT mit Ankerprimern um eine spezifische Sequenz verlängert, die das Gegenstück zu den RACE-Primern bildet.

Das Enzym basiert auf einer Moloney-Murine Leukemia Virus-Reversen Transkriptase (M-MuLV-RT). Die Terminal-Nukleotid-Transferase-Aktivität (TdT) der PowerScript RT erlaubt dabei die Verlängerung der Matrizen-RNA um den SMART II-Primer durch

Anfügen von Desoxycytidin-Resten an die neu gebildete cDNA. Die so um eine bekannte Sequenz 5'-terminal erweiterte cDNA kann für die 5'-RACE-PCR verwendet werden. cDNA-Synthese mittels 3'-CDS-Primer wurde für die Aufklärung der 3'-Termini mit Hilfe der 3'-RACE-PCR durchgeführt. Als 3'-CDS-Primer diente ein um die SMART II- Sequenz erweiterter oligo(dT)-Primer.

4.5.2. Synthese von 5'-cDNA mittels Terminaler Transferase

Die reverse Transkription wurde wie unter [III.4.5.1] beschrieben durchgeführt. Als Oligonukleotid wurde ein oligo-dT Primer eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde mit einem DNA Purification Kit (Macherey & Nagel) aufgereinigt und in 50 µl 10 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 aufgenommen. Ein Aliquot davon (10 µl) wurde zusammen mit 6,5 µl Nuklease-freiem Wasser, 5 µl 5x Tailing-Puffer und 2,5 µl 2 mM dCTP für 2 min bei 94 °C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und nach Zugabe von 1 µl TdT Enzym (Terminale Transferase) 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann bei 65 °C für 10 min gestoppt. Der so gebildete oligo-dC Rest diente in der folgenden Reaktion als Bindungsstelle für einen oligo-dG Ankerprimer (AAP; AUAP).

4.6. Isolierung von DNA

Zur DNA Isolierung mit dem DNeasy Plant Mini Kit [II.3] wurde in flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial (100 mg) eingesetzt. Die so erhaltene DNA wurde direkt zur PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

4.7. PCR (Polymerase-Chain-Reaction)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Die DNA-Polymerasen bedienen sich dazu einer kurzen Oligonukleotidsequenz (Primer), die sich an den komplementären Zielstrang anlagert. Dann knüpfen sie an bestehende freie 3'-OH Funktionen der Desoxyribose komplementäre Nukleotide an, analog der semikonservativen DNA-Replikation. Als Startsequenzen finden Primer von 18-25 Nukleotiden Länge Anwendung. Sowohl längere als auch kürzere Primersequenzen zeigen geringere Spezifitäten, die sich

durch „mispriming“ oder Bildung von Haarnadeln ausdrücken können. Als Matrize für die PCR können cDNA, genomische DNA oder Plasmid-DNA eingesetzt werden. DNA-Polymerasen für die PCR werden aus thermoresistenten Organismen gewonnen und von verschiedenen Anbietern rekombinant hergestellt. Man unterscheidet DNA-Polymerasen ohne Exonukleaseaktivität (z.B. *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) von sogenannten Proofreading-Polymerasen (z.B. *Pfu*-, *Pfx*-, *Pwo*-Polymerase). Letztere weisen die geforderte 3'→5' Exonukleaseaktivität auf und werden daher z.B. für DNA-Amplifikationen mit anschließender Klonierung in Expressionsvektoren eingesetzt. Ihre Fähigkeit fehlerhaft verknüpfte Nukleotide zu erkennen und auszutauschen drückt sich in einer sehr geringen Fehlerrate aus. Standard-PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Komponente	Volumen
Matrizen-DNA	1 µl
Primer sense [10 pmol/µl]	1 µl
Primer antisense [10 pmol/µl]	1 µl
dH ₂ O	12 µl
Diese Mischung wurde dem ersten Denaturierungsschritt unterworfen: Als „Mastermix“ wurden dann hinzugefügt:	
10 x Reaktionspuffer	2,5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2,5 µl
dNTPs [10 mM]	1 µl
Polymerase [5 units/µl]	0,1 µl
dH ₂ O	ad 25 µl

4.7.1. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Die RACE-Technik stellt eine PCR-Methode zur Identifizierung unbekannter 3'- und 5'-Regionen von cDNA-Fragmenten dar (Frohman et al. 1988). Das Verfahren beruht auf einer Verknüpfung der cDNA-Enden mit einem Ankerprimer, welcher während der cDNA-Synthese eingeführt wird [III.4.5.1]. Diese artifiziellen Enden können während der PCR mit RACE-Primern und einem genspezifischen Primer zur Aufklärung des offenen Leserahmens (ORF) genutzt werden. Diese Art der PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. In einer ersten Amplifikation wurde die Reaktion mit einem genspezifischen Primer und dem RACE-Long Primer durchgeführt. In einer zweiten Amplifikation wurde das Produkt der ersten Reaktion als Matrize eingesetzt.

Hierbei wurde der RACE-Short Primer und ein weiterer, ebenfalls innerhalb der bereits amplifizierten Sequenz gelegener, genspezifischer Primer verwendet. Durch dieses auch nested-PCR genannte Verfahren lässt sich die Spezifität der Methode deutlich erhöhen.

4.7.2. RT- PCR

Die RT-PCR stellt eine Kombination zweier Verfahren dar. Zunächst wird eine reverse Transkription durchgeführt [III.4.5] und anschließend eine Polymerasekettenreaktion [III.4.7]. Die RT-PCR wurde ausschließlich mit genspezifischen Primern durchgeführt. Sie wurde eingesetzt, um die Transkription verschiedener Gene in untersuchten RNA-Präparationen zu beurteilen. Die RT-PCR ist im Gegensatz zur real time RT-PCR ein semi-quantitatives Verfahren.

4.7.3. Semi-Nested PCR mit TATA-Box Primer

Um die 5' Region eines Gens zu identifizieren kann eine semi-nested PCR mit genomischer DNA durchgeführt werden. Dabei wird ein degenerierter Sense-Primer eingesetzt der an der TATA- Box hybridisiert [II.2.1]. Als Antisense-Primer dienen drei nacheinander gelegene genspezifische Primer, wobei der am weitesten am 3' Ende gelegene Primer für die erste, der nächste für die zweite und der dritte für die letzte PCR verwendet wird. Die TATA- Box liegt in der Promotorregion eukaryotischer Gene, ungefähr 25 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts.

4.7.4. SiteFinding PCR

Die SiteFinding-PCR stellt eine Variante des Chromosome Walking dar (Tan et al. 2005). Dabei wird genomische DNA eingesetzt. Das Sitefinder-Oligonukleotid besitzt am 3' Ende einige Inosin-Moleküle gefolgt von den vier unspezifischen Basen GCCT [II.2.1]. Damit bindet es nach der Denaturierung in einem langsam von 25°C bis 68°C ansteigenden Zyklus unspezifisch an verschiedenen Positionen der Template-DNA. Am 5' Ende befindet sich eine Überhang-Sequenz, die den geschachtelten

Sitefinding Primern komplementär ist. Daran schließt sich eine NcoI Schnittstelle an. Anschließend wird eine geschachtelte PCR mit genspezifischen Antisense-Primern des Zielgens und den Sitefinding-Primern durchgeführt. Dabei wird die Amplifikation von unspezifischen Produkten unterdrückt, da diese auf beiden Seiten den Überhang tragen, der eine Haarnadelstruktur bildet, welche dann die weitere Amplifikation verhindert. Die entstehenden Produkte werden von der Sequenz des SFP 2 und des innersten genspezifischen Primers begrenzt. Nach Verdau mit NcoI ergibt sich auf der einen Seite der spezifische Überhang des Restriktionsenzym und auf der anderen Seite ein glattes Ende der Primersequenz. Nun kann das Fragment in einen entsprechend verdauten Vektor ligiert werden.

4.8. Agarose- Gelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich mit Hilfe der Gelelektrophorese in einer Agarosematrix auftrennen. Diese Gele weisen eine Agarosekonzentration zwischen 1-2 % auf. Geringe Konzentrationen eignen sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten der Größe 100–10000 bp. Höhere Konzentrationen dienen der Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente. Ethidiumbromid interkaliert in DNA und kann bei 302 nm im UV-Licht detektiert werden. Agarosekonzentration und angelegte Spannung bedingen die Trennschärfe der Elektrophorese. Gele wurden durch Aufkochen der Agarose in TAE-Puffer und Zugabe von Ethidiumbromid hergestellt und auf Trägerschlitten mit Taschenkämmen ausgekühlt. DNA-Proben wurden zur Erhöhung der Dichte mit 6x Ladepuffer gemischt und parallel zu einem DNA-Größenmarker elektrophoretisch bei 110 V aufgetrennt.

4.9. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Durch Gelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente mussten aus der Matrix extrahiert werden. Dazu wurden unter UV-Licht die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits zurück gewonnen. Das Verfahren beruht auf der Schmelze des Gels in Extraktionspuffer, Adsorption der DNA an einer Kieselgelmatrix und abschließenden

Wasch- und Elutionsschritten. Die so extrahierte DNA kann direkt für weitere Arbeitsschritte eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

4.10. Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme lassen sich in drei Klassen einteilen. Typ I und Typ III klassifizierte Enzyme sind ATP-abhängig, besitzen Endonuklease- und Methylaseaktivität und schneiden DNA in unterschiedlicher Entfernung zur Erkennungssequenz. Es entstehen DNA Fragmente definierter Länge mit variablen Enden. Die hier verwendeten Typ II Endonukleasen sind nicht ATP-abhängige Enzyme, die Phosphodiesterbindungen der DNA an meist palindromischen Erkennungssequenzen hydrolysieren. Für den Restriktionsverdau wurde das entsprechende Enzym nach Angaben des Herstellers mit Puffer und DNA versetzt und für 60 min inkubiert.

Komponente	Volumen
DNA [50-200 ng/μl]	3 μl
Endonuklease	0,5 μl
10x Reaktionspuffer	2 μl
dH ₂ O	14,5 μl

4.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Linearisierte Plasmidvektoren können mit Hilfe von T4-DNA-Ligase DNA-Fragmente aufnehmen. Dabei kann man zwischen der Klonierung mit klebrigen Enden (sticky ends) und der Klonierung mit glatten Enden (blunt ends) unterscheiden. Klonierungen in die hier verwendeten Vektoren [II.1.3.2] erfolgten ausschließlich über sticky ends. Die Ligationen wurden bei 4 °C für 12-16 h durchgeführt. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug dabei 3:1 bis 10:1.

Komponente	Volumen
Vektor-DNA [50 ng/μl]	1 μl
Insert-DNA [50 ng/μl]	3 μl
10x Reaktionspuffer	1 μl
T4-DNA-Ligase [5 units/μl]	0,5 μl
dH ₂ O	ad 10 μl

4.11.1. Klonierung in das pGEM-T Easy Vektor System

Aus der PCR gewonnene DNA-Amplifikate können bei Verwendung von *Taq*-Polymerase direkt in einen T-Überhangvektor kloniert werden. Dabei macht man sich die Eigenschaft der Polymerase zu Nutze, die DNA-Synthese stets mit einem Überhang eines Desoxyadenosins abzuschließen. Dieser Überhang dient zur Klonierung in den komplementären Desoxythymidin-Überhangvektor, wobei die Insertionsrichtung nicht vorgegeben ist. Der pGEM-T Easy Vektor stellt ein high-copy Plasmid dar, welches benachbart der Multiple-Cloning-Site (MCS) T7- und SP6-RNA-Polymerasepromotoren besitzt. Die MCS ist ihrerseits in die *lacZ*-Kassette integriert, so dass erfolgreich eingefügte Inserts auf entsprechendem Medium mit X-Gal und IPTG durch Blau-Weißselektion identifiziert werden können. Der Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen. Mit pGEM-T Easy erstellte Vektorkonstrukte wurden für die Sequenzierung verwendet.

4.12. Transformation von *E. coli*

Für den Transfer von Vektorkonstrukten in kompetente Zellen wurden der unter [II.1.3.1] angegebene *E. coli*-Stamm verwendet. Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurde diese in kompetente *E. coli*-Zellen [III.4.2] vom Stamm DH5 α mittels Hitzeschock transferiert. 50 μ l der kompetenten *E. coli*-Zellen wurden mit 1-5 μ l Plasmid-DNA aus der Ligation versetzt und nach 20 min Inkubation auf Eis in einem Wasserbad für 45 sec auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock). Es wurde anschließend auf Eis für 2 min gekühlt und der Ansatz mit 950 μ l SOC-Medium gemischt. Nach einer Inkubation von 90 min bei 37 °C auf einem Schüttler wurden die Bakterien abzentrifugiert, in ca. 200 μ l SOC-Medium aufgenommen und auf Selektionsmedium ausgestrichen. Erfolgreich transformierte Bakterien konnten nach Inkubation über Nacht (37 °C) detektiert werden.

4.13. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde in *E. coli*-Zellen vom Stamm DH5 α über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler vermehrt und nach Methode der alkalischen Lyse (Bimboim and Doly 1979) isoliert. Die Ausbeuten dieses Verfahrens lagen bei 100-500 ng/ μ l. Zur

Durchführung der Methode wurden 2 ml der Übernachtskultur zentrifugiert und das Bakterienpellet in Puffer 1 [II.4.3.2] resuspendiert. Durch Zugabe von Puffer 2 wurde die alkalische Lyse mit SDS eingeleitet. RNase A baute störende RNA während der 5 min Inkubation bei Raumtemperatur ab. Durch Zugabe von Puffer 3 wurden zelluläre Bestandteile und Proteine während einer Inkubation für 20 min auf Eis gefällt. Der abzentrifugierte Überstand wurde mit Chloroform gewaschen und die Plasmid-DNA mit 2-Propanol 100% aus der wässrigen Phase präzipitiert. Das nach 30 min Zentrifugation sedimentierte Pellet wurde in Ethanol 70% gewaschen, anschließend bei 37 °C getrocknet und in 30 µl dH₂O aufgenommen.

4.14. Insertionskontrolle

Insertionskontrolle von Plasmiden dient der Überprüfung auf erfolgreiche Ligation und Transformation. Erfolgreiche Transformation wird im Allgemeinen durch eine vermittelte Antibiotika-Resistenz im Vektorkonstrukt überprüft. Transformierte kompetente *E. coli*-Zellen können sich so auf Selektionsmedium vermehren. Eine erfolgreiche Insertion von DNA-Fragmenten in den Vektor lässt sich z.B. durch Blau-Weißselektion kontrollieren. Dabei wird das *lacZ*-Gen des Vektors durch das Insert unterbrochen und eine Komplementierung der β -Galactosidase verhindert. Dieses führt auf Medium mit IPTG und X-Gal zur Bildung von weißen Kolonien, gegenüber blauen Kolonien bei intakter β -Galactosidase. Die erfolgreiche Ligation des Zielfragments wurde nach Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen überprüft. Dafür wurden jeweils das Insert flankierende Schnittstellen des Vektors verwendet und die Größe der Restriktionsfragmente mittels Elektrophorese [III.4.8] überprüft.

4.15. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer Absorption von UV-Licht photometrisch quantifiziert werden. Die Bestimmung der Konzentration [c] über die Absorption A erfolgte bei $\lambda = 260$ nm (Sambrook and MacCallum 2001b).

$$[c] = A \cdot \epsilon_{260} \cdot \text{Verdünnung}$$

$$\epsilon = \text{Extinktionskoeffizient}$$

Der Extinktionskoeffizient ϵ für $\lambda = 260 \text{ nm}$ beträgt:

ssDNA = 1,0 A \sim 50 ng/ μ l

dsDNA und RNA = 1,0 A \sim 33 ng/ μ l

Oligonukleotide = 1,0 A \sim 20 ng/ μ l

Darüber hinaus lässt sich durch Bildung des Verhältnisses der Extinktionen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ / $\lambda = 280 \text{ nm}$ die Reinheit von DNA-Präparationen abschätzen. Der Quotient sollte einen Wert zwischen 1,8–2,0 aufweisen. Geringere Werte deuten auf Verunreinigungen durch z.B. Proteine hin, die bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ absorbieren.

4.16. Herstellung eines T-Überhangvektors

Zur Herstellung des pGemT easy Vektors wurden blaue Kolonien [III.4.14] in einer Übernachtskultur vermehrt. Die Plasmid-DNA wurde wie unter [III.4.13] beschrieben isoliert. 10 μ g Plasmid-DNA wurden über Nacht bei 37° C mit 20 units EcoRV verdaut. Das Enzym erkennt das Palindrom 5'-GAT|ATC-3' und linearisiert den Vektor, wobei glatte Enden entstehen. Nach Ethanol-fällung wurde der T-Überhang erzeugt, indem 85 μ l des verdauten Vektors zwei Stunden mit 10 μ l Taq-Puffer, 2 μ l dTT (100 mM) und 3 μ l Taq-Polymerase (2U/ μ l) bei 70°C inkubiert wurden. Nach Phenolextraktion und Ethanol-fällung war der Vektor für Ligationsreaktionen einsatzbereit.

4.17. DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde der ABI PRISM 377 von Applied Biosystems eingesetzt. Das Verfahren beruht auf der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977). Dabei wird zunächst eine PCR mit genspezifischen Primern mit Plasmid-DNA als Matrize durchgeführt. Zusätzlich zu dNTPs werden dem Reaktionsansatz Didesoxynukleotide (ddNTPs) zugesetzt. Aufgrund der fehlenden Verknüpfungsstelle in 3'-Position der Didesoxyribose kommt es bei Einbau eines ddNTPs während der Elongation zum Kettenabbruch. Es werden während der PCR so alle denkbaren Längen der Matrizen-DNA bis zum jeweiligen Abbruch synthetisiert. Die ddNTPs tragen für jedes der vier möglichen Nukleotide jeweils individuelle Fluoreszenzfarbstoffe. Die so entstandenen, unterschiedlich langen ssDNA-Fragmente

werden auf einer Polyacrylamidmatrix elektrophoretisch getrennt und das terminale, fluoreszenzmarkierte Nukleotid mittels Laserlichtanregung detektiert.

4.17.1. Probenvorbereitung

Die PCR wurde mit dem BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Als Matrize diente 1 µg Plasmid-DNA [III.4.13]. Folgendes Reaktionsgemisch wurde verwendet:

Komponente	Volumen
BigDye [®] - Terminator	0,5 µl
Plasmid-DNA [1 µg/µl]	1µl
Primer [10 pmol/µl]	1µl
dH ₂ O	7,5 µl

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Schritt	Temp. [°C]	Zeit [sec]	Zyklen zu Schritt	Beschreibung
1	96	60		Denaturierung
2	96	30		Denaturierung
3	50	15		Anlagerung
4	60	240	25 x zu Schritt 2	Elongation
5	8	(pause)		Stopp

Die Kettenabbruchfragmente wurden nach der PCR durch Ethanolfällung aus einer 0,3 M Natriumacetatlösung von den übrigen Reaktionskomponenten getrennt. Die durch Zentrifugation sedimentierte DNA wurde mit Ethanol 70% gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurde die DNA in Ladepuffer aufgenommen und für 2 min bei 95 °C denaturiert.

4.17.2. PAGE für die DNA-Sequenzierung

Das Polyacrylamidgel für die DNA-Sequenzierung wurde in einer Stärke von 0,2 mm aus folgenden Komponenten blasenfrei gegossen:

Komponente	Masse, Volumen
Harnstoff	9 g
10x TBE-Puffer	3 ml
ddH ₂ O	11,5 ml
Acrylamid/Bis. 30%	3,75 ml
TEMED	10 µl
10% (w/v) APS	200 µl

Die durch APS gestartete und durch TEMED katalysierte Polymerisation des Acrylamids war nach 90 min abgeschlossen. Das fertige Gel wurde mit den Proben beladen und im ABI PRISM 377 entwickelt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte über die FacturaTM-Software (Perkin Elmer).

4.18. Auswertung von DNA-Daten

DNA-Sequenzen und daraus abgeleitete Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe der Software EditSeq, MegAlign, SeqMan und MapDraw von DNASTAR und GENTle analysiert. Für einen Datenbankvergleich mit bekannten DNA- und Aminosäuresequenzen wurde das Internetportal des NCBI mit der enthaltenen BLAST Suchoption (Altschul et al. 1997) verwendet.

IV. Ergebnisse

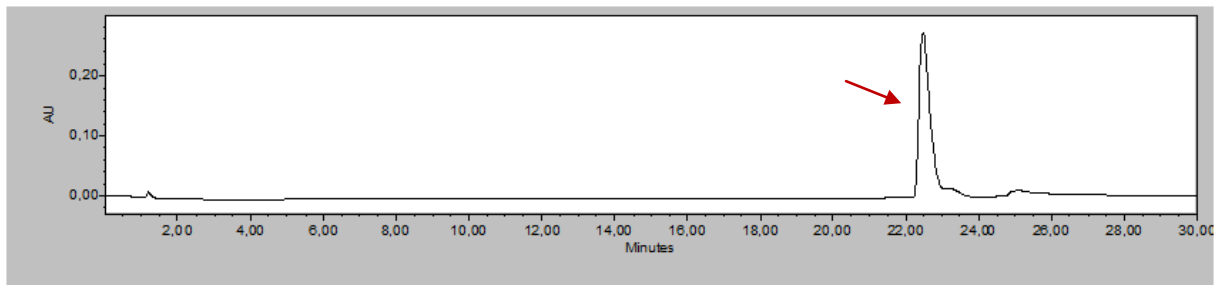
1. Nachweis von Prenyltransferase-Aktivität in *Hypericum perforatum*-Sprosskulturen

Der erste Prenylierungsschritt in der Hyperforin-Biosynthese konnte in *H. calycinum*-Zellkulturen bereits nachgewiesen werden (Boubakir et al. 2005). Die Zellkulturen stellen ein gutes *in vitro* System dar, welches unabhängig vom Vegetationszyklus der differenzierten Pflanzen einsetzbar ist, allerdings nur einen relativ geringen Gehalt an Hyperforinen (0,03%) aufweist. Da der Hyperforin-Gehalt in intakten Johanniskraut-Pflanzen jedoch wesentlich höher ist (1,5% in Blättern) (Sirvent et al. 2003), sollte die Prenyltransferase-Aktivität auch in differenzierten Johanniskrautpflanzen gezeigt werden. Diese können dann in molekularbiologischen Folgeuntersuchungen als potente mRNA Quelle dienen. Eingesetzt wurden sterile Sprosskulturen, die in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden waren.

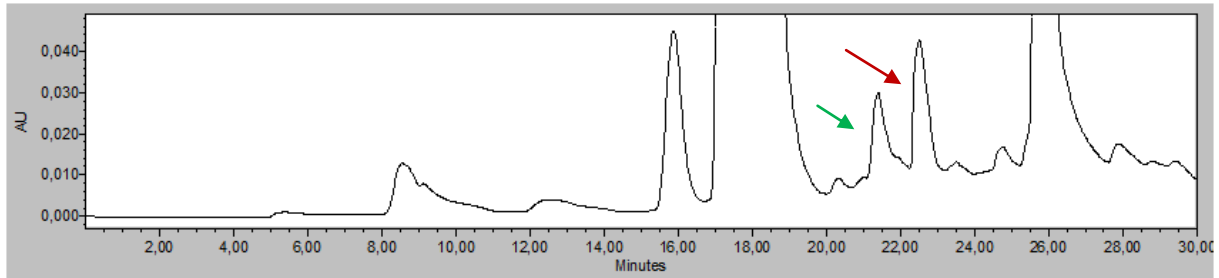
1.1. Detektion von Enzymaktivität

Nach Enzymextraktion [III.1.1] und Inkubation mit Phlorisobutyrophenon unter Verwendung von Fe^{2+} als Cofaktor (Boubakir et al. 2005) [III.1.3] wurden die Proben der HPLC Analyse unterworfen [III.2.2]. Es konnte die Bildung von zwei enzymatischen Produkten gezeigt werden, welche bei der denaturierten Probe nicht entstanden [Abbildung 10]. Die Retentionszeit des Hauptprodukts entsprach der von authentischem Prenylphlorisobutyrophenon (PPIBP), wie durch Co-Chromatographie von Referenz und enzymatischem PPIBP nachgewiesen wurde. Damit wiesen die aus den Sprosskulturen gewonnenen Proteinextrakte Prenyltransferase-Aktivität auf.

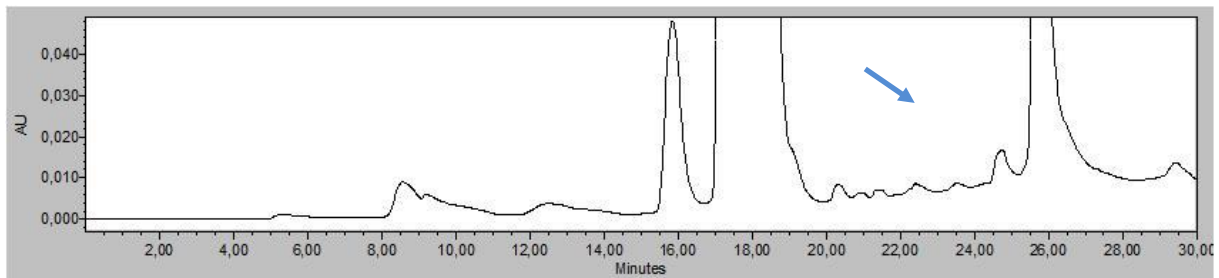
Chromatogramm 1: Authentisches Prenylphlorisobutyrophenon



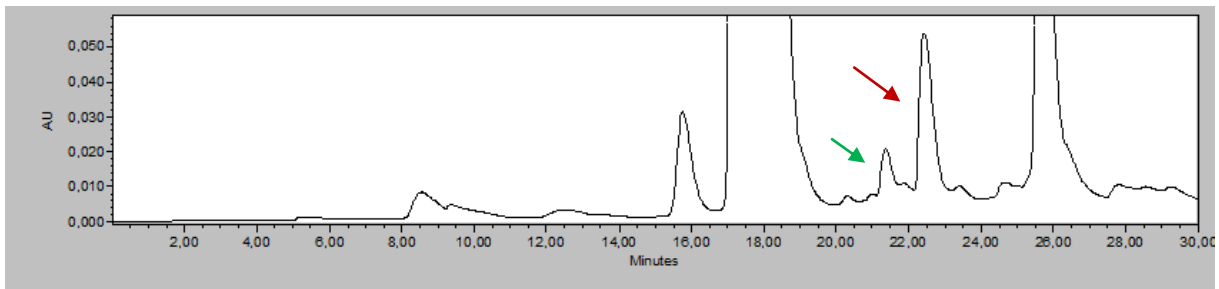
Chromatogramm 2: Ansatz mit Rohextrakt-Protein



Chromatogramm 3: Ansatz mit denaturiertem Rohextrakt-Protein



Chromatogramm 4: Co-Chromatographie von aktivem Ansatz und Referenz



Legende: roter Pfeil: Prenylphlorisobutyrophenon (PPIBP), grüner Pfeil: Zweites enzymatisches Produkt, blauer Pfeil: kein Produkt

Abbildung 10: Chromatogramme der HPLC-Analyse von Prenyltransferase-Ansätzen

Es kam während der Inkubation zur Bildung eines weiteren Produktes, welches im Chromatogramm ca. eine Minute vor dem gebildeten PPIBP erscheint. Vermutlich handelt es sich um das diprenylierte PIBP, welches in einer Folgereaktion aus PPIBP

entsteht [Abbildung 11]. Da keine Referenzsubstanz zur Verfügung stand, konnte eine Identifizierung nicht erfolgen.

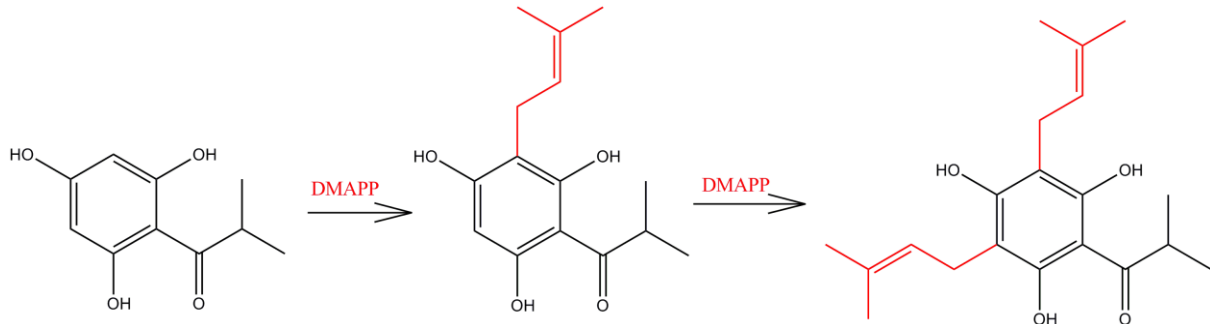


Abbildung 11: Erster und zweiter Prenylierungsschritt des Phlorisobutyrophenons

1.2. Spezifische Aktivität

Der Proteingehalt des zellfreien Rohextrakts aus den Sprosskulturen wurde nach der Methode von Bradford [III.1.2] bestimmt. Die Menge an gebildetem Prenylphlorisobutyrophenon pro Inkubation konnte anhand der AUC (area under the curve) im Vergleich zu der einer definierten Menge der authentischen Referenzsubstanz errechnet werden. Daraus ergab sich eine spezifische Aktivität von 56,7 $\mu\text{kat/kg}$ Protein. Im Gegensatz betrug die maximale spezifische Aktivität der Prenyltransferase in *H. calycinum*-Zellkulturen nur 3,6 $\mu\text{kat/kg}$ Protein (Boubakir et al. 2005).

2. Klonierung von Prenyltransferase-cDNA-Fragmenten aus *H. perforatum*

Wie oben ausgeführt sollte versucht werden, einen Teil der Biosynthese von Hyperforin in Johanniskraut, die sich bislang weitestgehend auf Vermutungen stützt, aufzuklären. Nach der Bildung des Grundgerüsts spielen vor allem die Prenylierungsreaktionen eine Rolle. Für Prenyltransferasen kodierende Gene sollten identifiziert und kloniert werden. Da keine Informationen über die Aminosäuresequenzen bekannt waren, wurde als Grundlage dieser Arbeit die

sogenannte Homologie-Klonierung gewählt. Diese Technik macht sich die Tatsache zunutze, dass bei einem Vergleich verschiedener Gensequenzen aus derselben Genfamilie konservierte Sequenzbereiche auftreten, in denen die Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuren-Abfolgen untereinander große Homologien aufweisen.

2.1. Design degenerierter Oligonukleotide

Zunächst fand ein Datenbankvergleich der Aminosäuresequenzen bekannter Prenyltransferasen statt, um homologe Bereiche zu finden, aus denen sich Primer mit möglichst niedrigem Degenerationsgrad generieren lassen. Da bislang nur zwei aromatische Prenyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels in der Datenbank zu Verfügung stehen, wurden auch bakterielle Enzyme einbezogen. Neben der Prenyldiphosphat-Bindestelle, dem typischen (N/D)DXXD Motiv, gab es in den ansonsten sehr unterschiedlichen Sequenzen noch zwei weitere Bereiche relativer Übereinstimmung [Abbildung 12]. Aus dem DKPIG(ST)W- und dem NDXXD-Motiv wurden zwei Sense-Primer und aus dem DTIYAHQ-Motiv ein Antisense-Primer erstellt [II.2.1.1].

M		DKPIG(ST)W		NDXXD		DTIYAHQ	
---	--	------------	--	-------	--	---------	--

Abbildung 12: Lage der degenerierten Primer in Konservierten Regionen von Prenyltransferasen

2.2. Gewinnung von poly (A⁺) RNA

Für die erfolgreiche Amplifikation gewünschter cDNA-Fragmente ist es wichtig, dass die für die reverse Transkription eingesetzte poly(A⁺)-RNA eine möglichst hohe Konzentration der gesuchten Transkripte aufweist. Nach Untersuchungen von (Tekel'ova et al. 2000) haben intakte *H. perforatum*-Pflanzen hohe Hyperforin-Konzentrationen in den Knospen, Blüten und Früchten. Der Hyperforin-Gehalt liegt in 3 mm großen Knospen bei 2,5 % des Trockengewichts und steigt bis zu 7 % in den 9-13 mm großen Knospen an [Abbildung 13]. Die ausgeprägte Bildung des Biosyntheseproduktes ist bedingt durch hohe Enzymaktivität, der in der Regel ein Konzentrationsmaximum der spezifischen mRNA vorausgeht. Davon ausgehend

wurden ca. 5 mm große Knospen geerntet und zur Isolierung von poly(A⁺)-RNA eingesetzt. Allerdings enthalten insbesondere die Knospen und Blüten eine Reihe anderer Sekundärstoffe, die sich negativ auf die Stabilität der poly(A⁺)-RNA auswirken können. Da *H. perforatum*-Blätter in ihren vielen durchscheinenden Ölbehältern ebenfalls Hyperforin akkumulieren (ca. 1,5%; (Soelberg et al. 2007)), wurden auch junge Blätter gesammelt und eingesetzt. Die Pflanzenteile wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und direkt verwendet oder zur späteren Benutzung bei -80°C gelagert. Poly(A⁺)-RNA wurde analog III.4.4.1 isoliert und nach III.4.5. in cDNA umgeschrieben, die als Template für die PCR eingesetzt wurde.

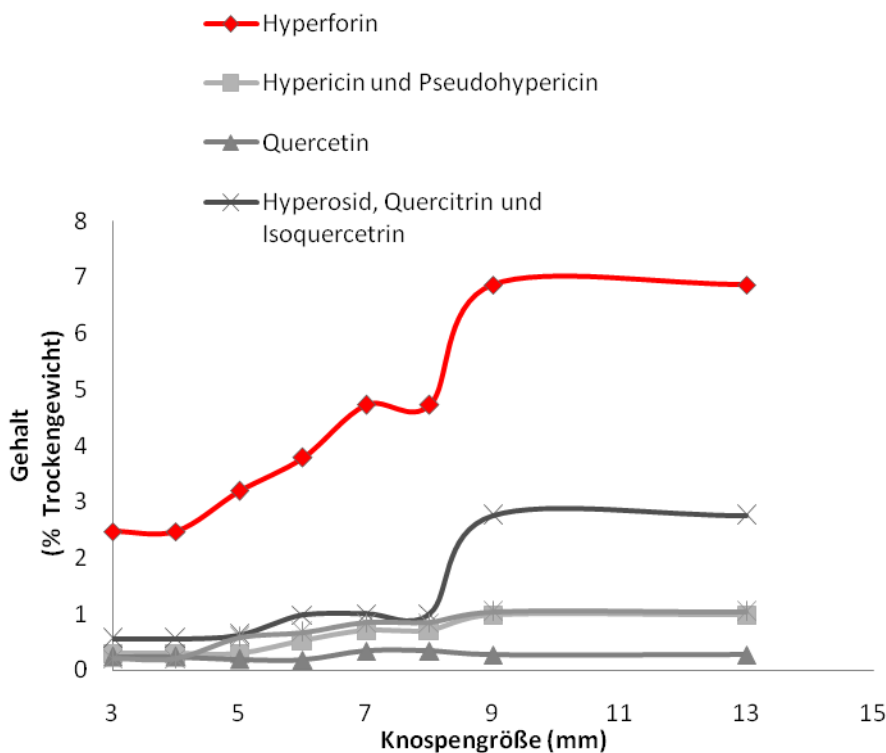


Abbildung 13: Steigender Hyperforingehalt in Knospen von *H. perforatum*.
Daten aus (Tekel'ova et al. 2000)

2.3. Amplifikation eines Prenyltransferase-Fragments

Mit den oben entworfenen Primern sowie RACE-Primern wurden verschiedene PCR-Reaktionen [III.4.7] durchgeführt. Da es sich bei degenerierten Primern um Oligonukleotid-Gemische handelt, sind die angegebenen Schmelztemperaturen nur ungefähre Richtlinien. Daher wurden die PCR-Ansätze bei Annealing-Temperaturen

von 60-40°C in 2°C Schritten getestet. Desweiteren wurden sogenannte Touch-down PCRs durchgeführt. Dabei wird die Annealing-Temperatur in den ersten 10 Zyklen jeweils um 0,5 oder 1°C abgesenkt, um dann für weitere 20 Zyklen auf der niedrigsten Temperatur zu verbleiben. Diese Methode verhindert die Bildung unspezifischer Amplifikate. Als weitere Maßnahme zur Verminderung unspezifischer Produkte wurden alle PCRs als Heißstart-Reaktion durchgeführt. Zusätzlich wurde durch Variation der Mg^{2+} -Konzentration und Zugabe von DMSO in den PCR-Ansätzen versucht, möglichst wenige Schmierbanden zu erhalten.

Es wurden meistens zwei Amplifikationen durchgeführt, um die Ausbeute der PCR zu erhöhen. Beim Einsatz von RACE-Primern erfolgte die erste Amplifikation mit RACE_{long} und die zweite als geschachtelte PCR mit RACE_{short} oder RACE_{nested}, was zusätzlich zur Erhöhung der Spezifität beitrug [Abbildung 14, Abbildung 15].

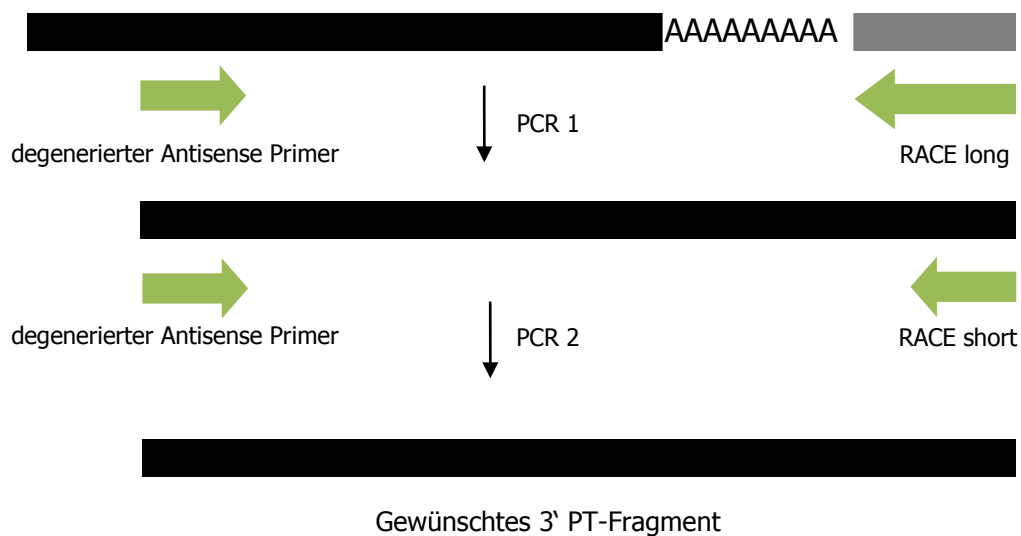


Abbildung 14: Schema der PCR mit degenerierten und RACE-Primern

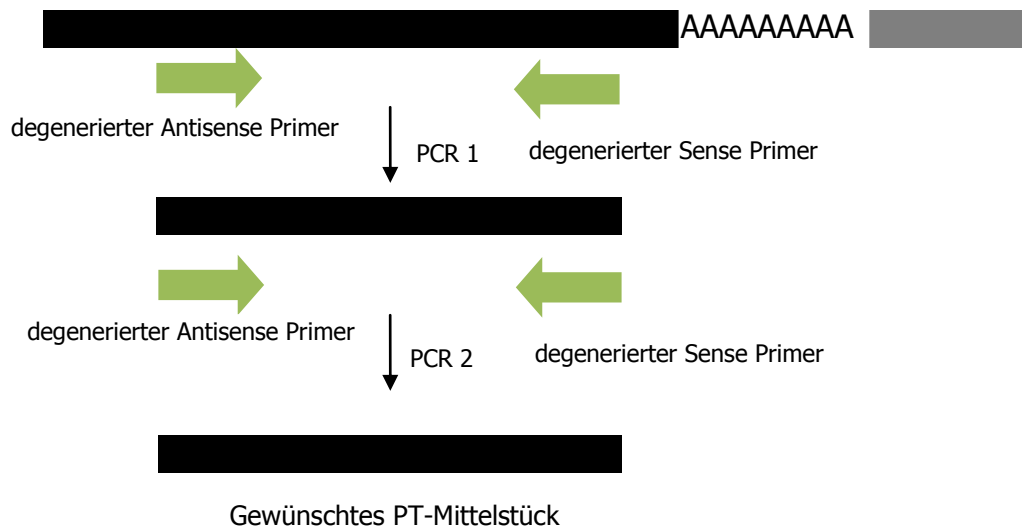


Abbildung 15: Schema der PCR mit degenerierten Primern

Es konnte schließlich ein 400 bp großes Fragment gewonnen werden. Dieses wies nach Vervielfältigung und Sequenzierung im Datenbankvergleich hohe Übereinstimmungen mit bekannten pflanzlichen Prenyltransferasen auf [Abbildung 16]. Die Prenyltransferasen aus *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana* sind dem Ubichinon-Stoffwechsel zuzuordnen (Ohara et al. 2006, Okada et al. 2004) und gehören damit zu den Polyprenyltransferasen, während die Prenyltransferase aus *Lithospermum erythrorhizon* an der Bildung von Shikonin beteiligt ist und somit ein Enzym des Sekundärstoffwechsels darstellt, welches nur Geranyldiphosphat als Prenyldonor akzeptiert (Yazaki et al. 2002).

Ergebnisse

a)

	T	V	N	D	L	L	D	R	D	I	D	X	K	V	E	R	T	K	L	R	P	X	A	S	G	X	L	T	P	F	Q	G	L	Majority						
	10										20										30																			
1	T	V	N	D	L	L	D	R	D	I	D	R	K	V	E	R	T	R	L	R	P	V	A	S	G	R	L	T	P	F	Q	G	L	Hypericum Perforatum.PRO						
1	T	V	N	D	L	L	D	R	D	I	D	N	K	V	E	R	T	K	S	R	P	F	A	S	G	I	L	T	P	T	Q	G	V	Oryza sativa.PRO						
1	T	I	N	D	L	L	D	Q	D	I	D	T	K	V	D	R	T	K	L	R	P	I	A	S	G	L	L	T	P	F	Q	G	I	Arabidopsis thaliana.PRO						
1	T	I	N	D	Y	F	D	R	D	F	D	K	K	V	E	R	T	K	S	R	P	L	A	S	G	A	V	S	P	A	K	G	L	Lithospermum erythrorhizon						
	G	F	L	G	L	Q	L	L	L	G	L	G	I	L	L	Q	L	N	N	Y	S	R	I	L	G	A	S	S	L	F	L	V	F	Majority						
	40										50										60																			
34	C	F	L	G	F	Q	L	L	L	G	L	G	I	L	L	Q	L	N	N	Y	S	Q	I	L	G	A	S	S	L	F	L	V	F	Hypericum Perforatum.PRO						
34	G	F	L	G	L	Q	L	L	L	G	L	G	I	L	L	Q	L	N	N	Y	S	R	I	L	G	A	S	S	L	F	L	V	F	Oryza sativa.PRO						
34	G	F	L	G	L	Q	L	L	L	G	L	G	I	L	L	Q	L	N	N	Y	S	R	V	L	G	A	S	S	L	L	V	F	Arabidopsis thaliana.PRO							
34	W	W	L	A	F	Q	L	F	I	G	L	G	V	L	Y	Q	F	N	I	L	T	L	A	L	A	I	V	H	V	P	F	V	F	Lithospermum erythrorhizon						
	S	Y	P	L	M	K	R	F	T	F	W	P	Q	A	F	L	G	L	T	I	N	W	G	A	L	L	G	W	S	A	V	K	G	Majority						
	70										80										90																			
67	S	Y	P	L	M	K	G	F	T	F	W	P	Q	A	Y	L	G	L	T	F	N	W	G	A	L	L	G	W	S	A	V	R	G	Hypericum Perforatum.PRO						
67	S	Y	P	L	M	K	R	F	T	F	W	P	Q	A	Y	L	G	L	T	F	N	W	G	A	L	L	G	W	A	A	I	K	E	Oryza sativa.PRO						
67	S	Y	P	L	M	K	R	F	T	F	W	P	Q	A	F	L	G	L	T	I	N	W	G	A	L	L	G	W	T	A	V	K	G	Arabidopsis thaliana.PRO						
67	A	Y	P	L	M	K	R	I	T	Y	W	P	Q	A	F	L	G	V	M	I	S	W	G	A	L	L	G	S	S	A	L	K	G	Lithospermum erythrorhizon						
	S	L	D	P	A	I	I	L	P	L	Y	X	S	G	V	F	W	T	L	V	Y	D	T	I	Y	A	H	Q	D	K	Majority									
	100										110										120																			
100	G	L	D	L	A	V	I	L	P	L	Y	A	G	G	V	F	W	T	L	V	Y	D	T	I	Y	A	H	Q	D	K	Hypericum Perforatum.PRO									
100	S	L	D	P	A	I	I	L	P	L	Y	T	A	G	I	C	W	T	L	V	Y	D	T	I	Y	A	H	Q	D	K	Oryza sativa.PRO									
100	S	I	A	P	S	I	V	L	P	L	Y	L	S	G	V	C	W	T	L	V	Y	D	T	I	Y	A	H	Q	D	K	Arabidopsis thaliana.PRO									
100	S	V	V	P	S	I	A	Y	P	L	Y	I	S	S	F	F	W	T	L	V	Y	D	T	I	Y	A	H	Q	D	K	Lithospermum erythrorhizon									

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid deep red) residues that differ from Hypericum Perforatum.PRO.□

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid deep red) residues that differ from Hypericum Perforatum.PRO.□

b)

Pflanze	Übereinstimmung
<i>Oryza sativa</i>	82%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	78%
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	55%

Abbildung 16: a) Aminosäurenabgleich des aus *H. perforatum* amplifizierten Fragments mit bekannten Prenyltransferasen. Von der *H. perforatum*-Sequenz abweichende Aminosäuren sind rot unterlegt. b) Prozentuale Übereinstimmung

3. Organspezifische Expression

Um erste Hinweise zu erhalten, ob das amplifizierte cDNA-Fragment für eine Prenyltransferase des Sekundärstoffwechsels kodiert und für die Hyperforin-Biosynthese relevant sein kann oder eher dem Ubichinonstoffwechsel zugehört, wurden semiquantitative RT-PCR-Ansätze durchgeführt [III.4.7.2]. Dafür wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Pflanzenorganen isoliert [III.4.4.2]. Hyperforinakkumulation wurde ausschließlich in den oberirdischen Pflanzenorganen beschrieben, nicht jedoch in der Wurzel (Soelberg et al. 2007). Somit wurde Gesamt-RNA aus dem Stempel, den Blättern, dem Rhizom und der Wurzel gewonnen [Abbildung 17]. Das Rhizom stellt botanisch eine gestauchte Sprossachse dar und zählt damit anatomisch zu den oberirdischen Pflanzenorganen, obwohl es unterirdisch wächst.

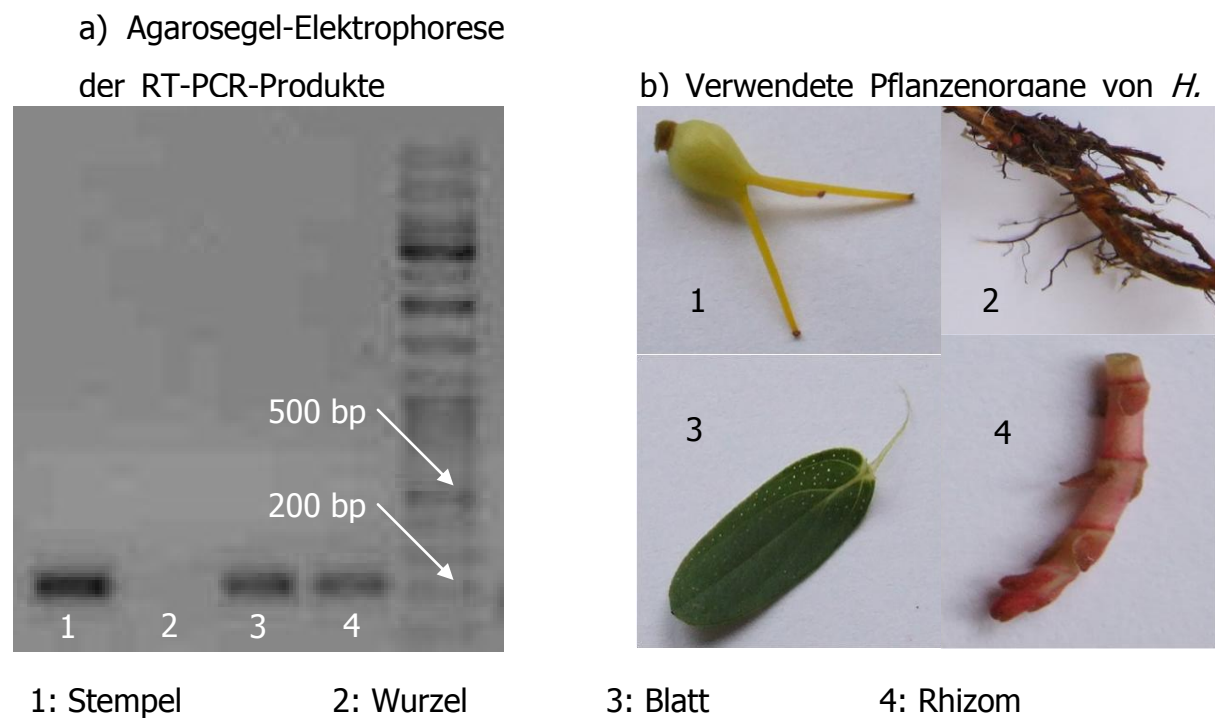


Abbildung 17: PT-Expression in verschiedenen Pflanzenorganen

Direkt nach der reversen Transkription wurde mit jeweils 2 µl der cDNA-Lösung eine PCR mit den Primern AS1 und S1 durchgeführt [II.2.1.2]. Die erwartete Fragmentgröße zwischen den Primern lag bei 200 bp [Abbildung 18].

Nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel wurden für die drei Hyperforin führenden Pflanzenorgane Banden der erwarteten Größe detektiert. Kein PCR-Produkt konnte mit der cDNA-Probe aus der Wurzel amplifiziert werden. Da es sich um eine semiquantitative Methode handelt, konnte außerdem anhand der Bandenstärke eine gewisse Aussage über den Expressionsgrad gemacht werden. Die stärkste Bande war im Gel mit der cDNA-Probe aus dem Stempel zu sehen. Etwas schwächer erschien der Expressionsgrad in Blättern und am schwächsten der im Rhizom. Diese Ergebnisse stimmen gut mit dem Hyperforin-Gehalt der verschiedenen Pflanzenteile überein (Repcák and Mártonfi 1997, Umek et al. 1999). Zwar ist noch nicht geklärt, ob der Akkumulationsort gleichzeitig der Syntheseort ist, aber das gilt als wahrscheinlich (Soelberg et al. 2007).

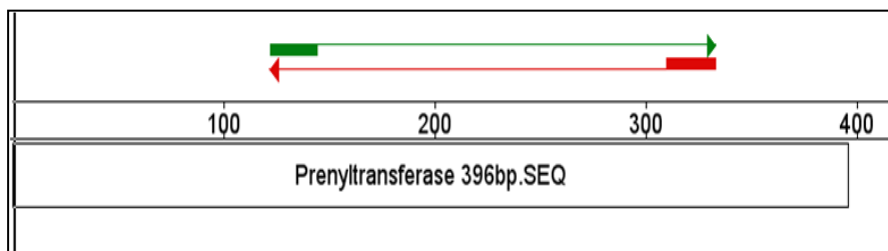


Abbildung 18: Erwartete Fragmentgröße zwischen Primer Pren AS1 (rot) und Pren S1 (grün)

Um auszuschließen, dass die Qualität der eingesetzten Gesamt-RNA aus den verschiedenen Organen möglicherweise durch Degradierung oder Ähnliches gemindert wurde, erfolgte mit den verwendeten cDNA-Proben eine Kontroll-PCR. In jeder eukaryotischen Zelle kommt das Strukturprotein Aktin vor. Die Gene dafür sind hoch konserviert. Aus dem bekannten Aktin-Gen von *Oryza sativa* wurde ein Sense- und ein Antisense-Primer abgeleitet. Im Agarosegel der PCR-Produkte war für jede cDNA-Probe eine Bande in der erwarteten Größe von ca. 400 bp zu sehen.

Damit schien das klonierte cDNA-Fragment für eine Prenyltransferase der Hyperforin-Biosynthese und nicht für eine Prenyltransferase des Ubichinon-Stoffwechsels zu kodieren, denn die entsprechende mRNA hätte dann auch in der Wurzel exprimiert werden müssen.

4. Amplifikation des 3'-Endes mittels RACE-Technik

Nachdem die Wahrscheinlichkeit hoch war, dass es sich bei dem klonierten Fragment um ein solches der gesuchten Prenyltransferase-cDNA handelte, wurde versucht dieses zunächst in Richtung des 3'-Endes zu verlängern. Dazu wurde die RACE-Technik angewendet, welche erlaubt aus kurzen Mittelfragmenten die gesamte cDNA zu klonieren (Frohman et al. 1988). Die Verwendung der Technik mit degenerierten Primern, um gänzlich unbekannte cDNAs zu amplifizieren wie unter IV.2 beschrieben, stellt eine der vielfältigen Modifikationen dieser Methode dar.

Die RACE-Technik lässt sich in 3'-RACE und 5'-RACE unterteilen, wobei mit Ersterer eine Verlängerung zum 3'-terminalen poly(A⁺)-Bereich erreicht wird und das davor liegende Translations-Stoppocodon eingeschlossen ist [Abbildung 19].

Dafür wurde wie unter III.4.4.1 beschrieben poly(A⁺)-RNA isoliert. Diese wurde für die unter III.4.5.1 beschriebene cDNA Synthese eingesetzt. Der dabei benutzte 3'-CDS Primer bindet an das poly(A⁺)-Ende der mRNA. Die eingesetzte reverse Transkriptase amplifiziert im Anschluss die Erststrang-cDNA.

Aus dem 400 bp langen Mittelfragment wurden genspezifische Sense-Primer abgeleitet [II.2.1.2]. Im Folgenden wurde mit dem RACE_{long}-Primer und einem genspezifischen Sense-Primer eine PCR nach III.4.7 durchgeführt. Ein Mikroliter der PCR-Produkt-Lösung wurde entnommen und als Matrize für die anschließende Nested-PCR eingesetzt. Hierfür wurden ein etwas abwärts gelegener genspezifischer Sense-Primer und der RACE_{short}-Primer benutzt. Alternativ wurde für beide Reaktionen eine Kombination aus 1 µM RACE_{short} und 0,2 µM RACE_{long} verwendet, die als Universal Primer Mix (UPM) bezeichnet wird. Um die Spezifität noch weiter zu erhöhen, wurde zum Teil eine dritte Reaktion mit einem weiter strangabwärts gelegenen Sense-Primer und/oder dem RACE_{nested} Primer vorgenommen. Alle verwendeten Primer-Kombinationen sind in Abbildung 20 dargestellt.

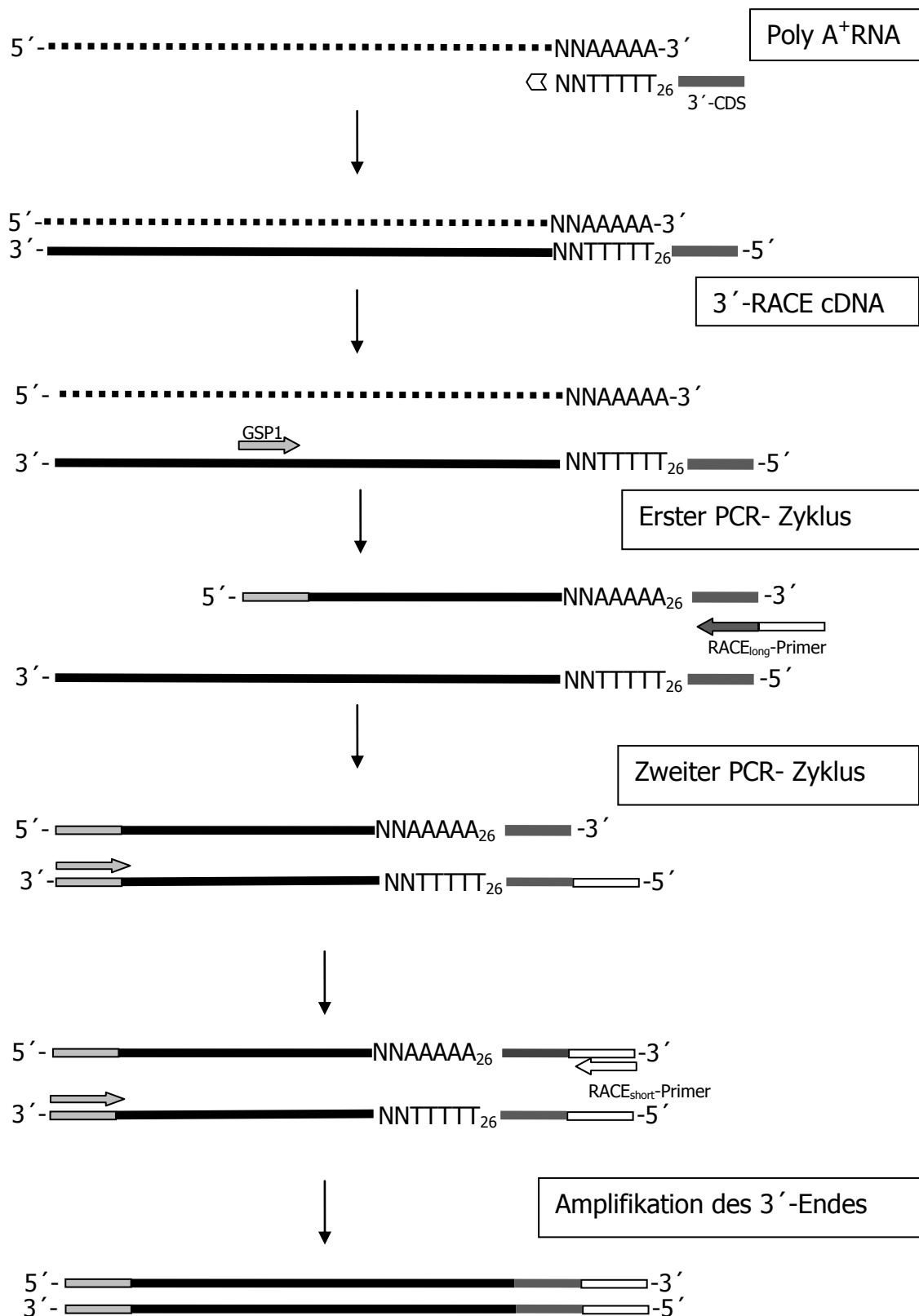




Abbildung 19: Schema der 3'-RACE

Die PCR-Reaktionen wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Schmelztemperatur (T_m) bei verschiedenen Temperaturen und auch als Touch-down PCR durchgeführt.

Erhaltene PCR-Produkte wurden sequenziert. Es konnte zunächst eine Verlängerung des Fragments um 200 bp erreicht werden. In diesem verlängerten Bereich wurde ein neuer Primer (Pren AS5) abgeleitet, der als innerster Sense-Primer in der zweiten oder dritten Amplifikation der folgenden PCR-Reaktionen eingesetzt wurde. Schließlich konnte ein Produkt amplifiziert werden, welches am Ende das Translations-Stoppocodon mit anschließendem poly-(A⁺)- Bereich enthielt.

<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1; text-align: center;">Sense-Primer</div> <div style="flex: 1; text-align: center;">Antisense-Primer</div> </div>		Pren S 1	Pren S 2	Pren S 3	Pren S 4	Pren S 5
						
RACE _{long}		1.	1.	1.	1.	
RACE _{long/short}		1.a	1.a +2.a	1.a +2.a	1.a +2.a	2.a
RACE _{short}			2.	2.	2.	2.
RACE _{nested}			3. +3.a	3. +3.a	3. +3.a	3. +3.a

1., 1.a: erste PCR

2., 2.a: zweite PCR mit 1 µl Produkt aus 1. bzw. 1.a als DNA-Matrize

3., 3.a: dritte PCR mit 1 µl Produkt aus 2. bzw. 2.a als DNA-Matrize

Die Kombination der PCR-Reaktionen war jeweils nur in Pfeilrichtung möglich.

Abbildung 20: Primerkombinationen für die Nested-3'-RACE PCR

5. Verlängerung der PT-cDNA in Richtung des 5' - Endes

5.1. Verwendung der 5' -RACE Technik

Nachdem die RACE-Technik bei der Amplifikation des 3'-Endes zum gewünschten Erfolg geführt hatte, fand sie weiterhin Einsatz beim Versuch den vollständigen offenen Leserahmen (ORF= open reading frame) zu amplifizieren.

Die 5'-RACE Technik stellt sich im Vergleich zur 3'-RACE Technik deutlich schwieriger dar, da dem Translations-Startcodon AUG keine konservierte Region vorangeht. Am 3'-Ende des ORF schließt sich der poly(A⁺)-Bereich dem Translations-Stoppcodon an. Dieser Bereich wird bei der Erststrangsynthese mit dem 3'-CDS Primer genutzt, um den ORF um eine definierte Nukleotid-Sequenz zu erweitern. Dort lagert sich der RACE-Primer bei der anschließenden PCR an.

Bei der 5' - RACE wird während der reversen Transkription ein Oligonukleotid-Anker an das 5'-Ende der mRNA angefügt, der als Verlängerung der RNA-Matrize dient und ebenfalls in cDNA umgeschrieben wird. Dieser Vorgang wird durch die Terminale-Nukleotid-Transferase-Aktivität (TdT) der benutzten M-MuLV-RT ermöglicht, welche an das cDNA-Ende einige Cytidin-Nukleotide anfügt. Daran lagert sich der auf drei Guanosin-Nukleotide endende Oligonukleotid-Anker an. Dadurch erhält man schließlich am 5'-Ende der cDNA ebenfalls eine bekannte Oligonukleotid-Sequenz, an die der RACE-Primer bei der nachfolgenden PCR bindet [Abbildung 21].

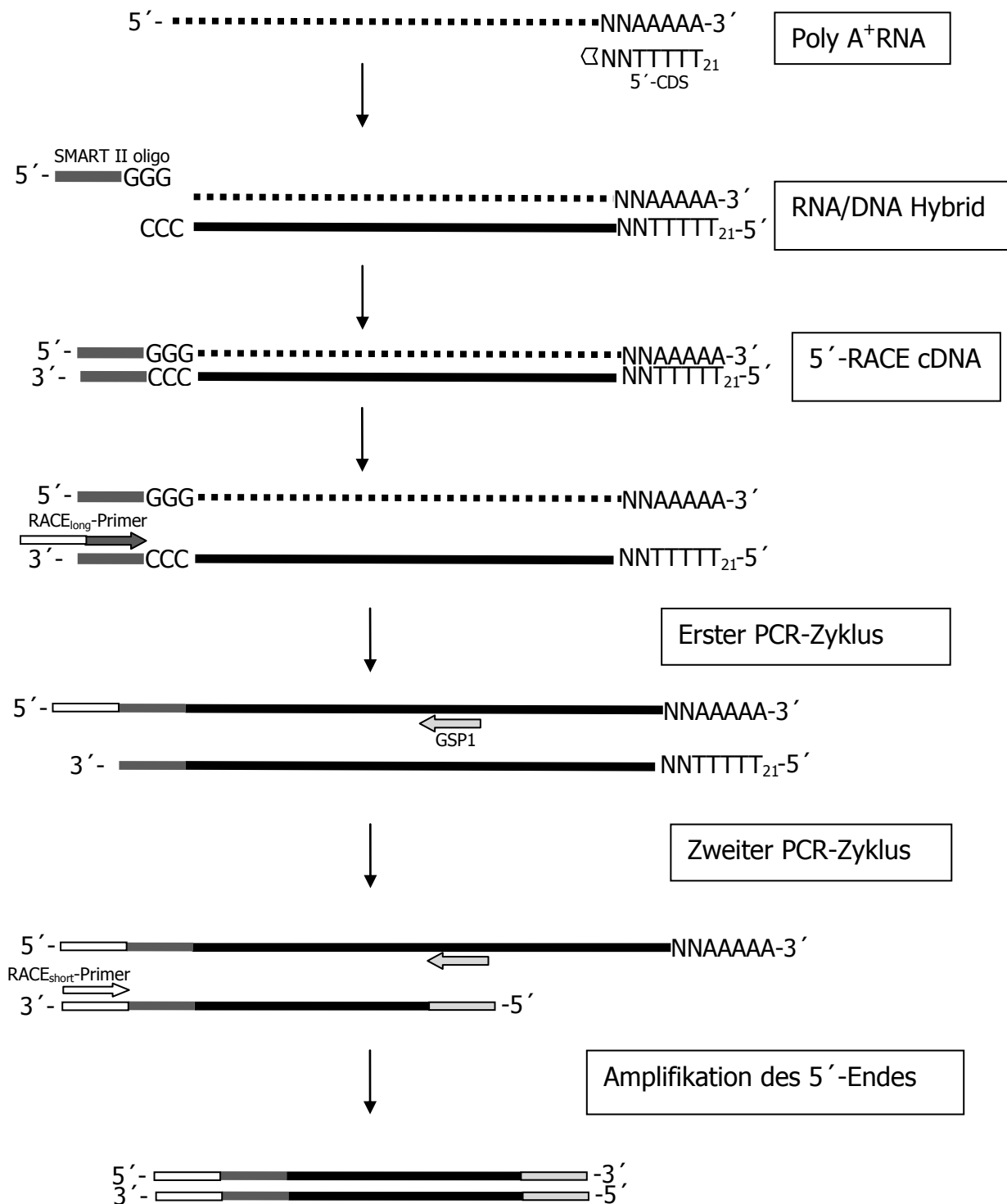


Abbildung 21: Schema der 5'-RACE

Es wurde poly(A⁺)-RNA nach III.4.4.1 gewonnen und nach III.4.5.1 in cDNA umgeschrieben. Aus dem bekannten Fragment wurden genspezifische Antisense-Primer entworfen. Diese wurden in allen möglichen Kombinationen unter Berücksichtigung der T_m mit den RACE-Primern in sehr vielen verschiedenen PCR-Reaktionen eingesetzt [Abbildung 22]. Die Reaktionsansätze wurden für jede Primerkombination durch Variation der Mg²⁺-Konzentration, durch Zugabe von DMSO oder Formamid und durch veränderte Temperaturprogramme optimiert. Dadurch gelang es, eine Verlängerung des vorhandenen Fragments um ca. 100 bp zu erreichen.



Auf Grundlage dieser Sequenz wurden zwei neue Primer (Pren AS 5 und Pren AS 6) erstellt, die in den nachfolgenden PCR-Reaktionen in den oben genannten Variationen zum Einsatz kamen.

Die Erststrangsynthese wurde auch mit den genspezifischen Antisense-Primern durchgeführt. Dabei verzichtet man auf den am poly-(A⁺)-Bereich bindenden 5'-CDS-Primer. Der genspezifische Primer bindet an der komplementären mRNA-Sequenz und bildet somit den Ausgangspunkt für die reverse Transkription. Die Länge der umzuschreibenden Sequenz wird deutlich verkürzt, wodurch sich die Abbruch- und Fehlerrate verringert. Diese Methode hat außerdem den Vorteil, dass nur die für die Prenyltransferase kodierende mRNA transkribiert wird. Die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Amplifikate wird damit gemindert.

Da so jedoch die Qualität der gewonnenen cDNA nicht mehr durch Amplifikation bekannter Fragmente überprüft werden konnte, wurde parallel immer cDNA mit dem 5'-CDS-Primer hergestellt.

Es gelang abermals eine Verlängerung um ca. 100 bp zu erreichen. Wieder wurden neue Antisense-Primer (Pren AS 6,5 und Pren AS 7) erstellt und für die PCR eingesetzt. Leider glückte es trotz mannigfaltiger Versuche nicht, die Sequenz weiter zu verlängern. Ein Grund könnte sein, dass Sekundärstrukturen in der mRNA vorliegen, die die reverse Transkriptase behindern. So kann die RT-Reaktion nicht vollständig ablaufen und der Anker-Primer bindet stromabwärts vom tatsächlichen 5'-Ende. Oder der Primer bindet unspezifisch an eine interne Sequenz und erschwert dadurch die RT-Reaktion. Als weitere Möglichkeiten kämen ein partieller Abbau der mRNA durch Nukleasen und eine Blockade durch phenolische Pflanzeninhaltsstoffe in

Frage. Dadurch wird die Matrize für die reverse Transkriptase verkürzt und das 5'-Ende nicht komplett in die cDNA umgeschrieben. Um diese Prozesse zu unterbinden, wurde eine RNA-Extraktionsmethode benutzt, die für die Isolation von RNA aus Pflanzen mit phenolischen Inhaltsstoffen entwickelt wurde (Jaakola et al. 2001) [III.4.4.3]. Desweiteren wurden abermals neue Primer entworfen (Pren Rev 1, Pren Rev 2 und Pren Rev 3), die mit 27-28 Nukleotiden ungefähr 5 Nukleotide länger waren als die vorher benutzten. Dadurch erhöhten sich die Schmelztemperatur und die Spezifität. Allerdings konnten auch diese Strategien die cDNA-Sequenz nicht komplett bis zum 5'-Ende vervollständigen. Die erreichte Verlängerung betrug nur ca. 50 bp.

Antisense Primer \ Sense Primer		Pren AS 4	Pren AS 1	Pren AS 2	Pren AS 5	Pren AS 6	Pren AS 7
							
RACE _{long}		1.	1.	1.	1.	1.	
RACE _{long/short}		1.a	1.a +2.a	1.a +2.a	1.a +2.a	1.a +2.a	2.a
RACE _{short}			2.	2.	2.	2.	2.
RACE _{nested}			3. +3.a	3. +3.a	3. +3.a	3. +3.a	3. +3.a

1., 1.a: erste PCR

2., 2.a: zweite PCR mit 1 µl Produkt aus 1. bzw. 1.a als DNA-Matrize

3., 3.a: dritte PCR mit 1 µl Produkt aus 2. bzw. 2.a als DNA-Matrize

Eine Kombination der PCR-Reaktionen war jeweils nur in Pfeilrichtung möglich.

Abbildung 22: Primerkombinationen für die nested 5'-RACE PCR

5.2. Modifizierte RACE-PCR mittels Terminaler Transferase

Eine weitere Möglichkeit, die vollständige Prenyltransferase-cDNA zu amplifizieren, schien eine der RACE-PCR verwandte Methode zu sein. Mit Hilfe der terminalen Transferase (TdT) wurde eine 5'-cDNA synthetisiert [III.4.5.2]. Das Enzym TdT addiert an das 5'-Ende einen oligo-dC-Rest, der eine Bindungsstelle für einen

Ankerprimer darstellt. Durch diesen zusätzlichen Schritt wird gewährleistet, dass der Ankerprimer tatsächlich an die RNA binden kann.

In der PCR-Reaktion wurde statt des RACE_{long/short} Primers ein AUAP-Primer und für die geschachtelte PCR ein AAP-Primer verwendet. Allerdings blieb diese Methode ohne Erfolg und führte nicht zu der erwünschten vollständigen PT-cDNA.

6. Versuche zur Sequenzverlängerung mit genomischer DNA

Da die obigen Methoden zur Erlangung der vollständigen PT-cDNA nicht zum gewünschten Erfolg führten, wurde parallel versucht Sequenzinformationen aus genomischer DNA zu erhalten. Diese könnten zwar durch enthaltene Introns nicht direkt zur Überexpression des Enzyms genutzt werden, aber möglicherweise ließen sich aus den neuen Sequenzinformationen am 5'-Ende bindende genspezifische Primer ableiten. Diese könnten als Sense-Primer auf eine cDNA-Matrize bei der PCR angesetzt werden.

6.1. Semi-Nested PCR mit degeneriertem TATA-BOX-Primer

Es wurde genomische DNA nach III.4.6 isoliert. Diese wurde in drei aufeinanderfolgenden Touch-down PCR-Reaktionen als Matrize verwendet [III.4.7.3]. Als Sense-Primer diente ein degenerierter Primer, der an der TATA-Box binden sollte. Als Antisense-Primer wurden Pren Rev 1,2 und 3 eingesetzt [Abbildung 23]. Leider kam es nur zur Amplifikation unspezifischer Produkte. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Sequenz im Bereich der TATA-Box sich stark von der des Primers unterscheidet und es daher nicht zur Bindung des Primers kommt. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass die von der mRNA abgeleiteten Primer in der genomischen DNA von einem Intron unterbrochen werden und somit nicht hybridisieren können. Aus diesem Grund wurden weitere Primer-Kombinationen ausprobiert, die jedoch auch zu keinem Erfolg führten.

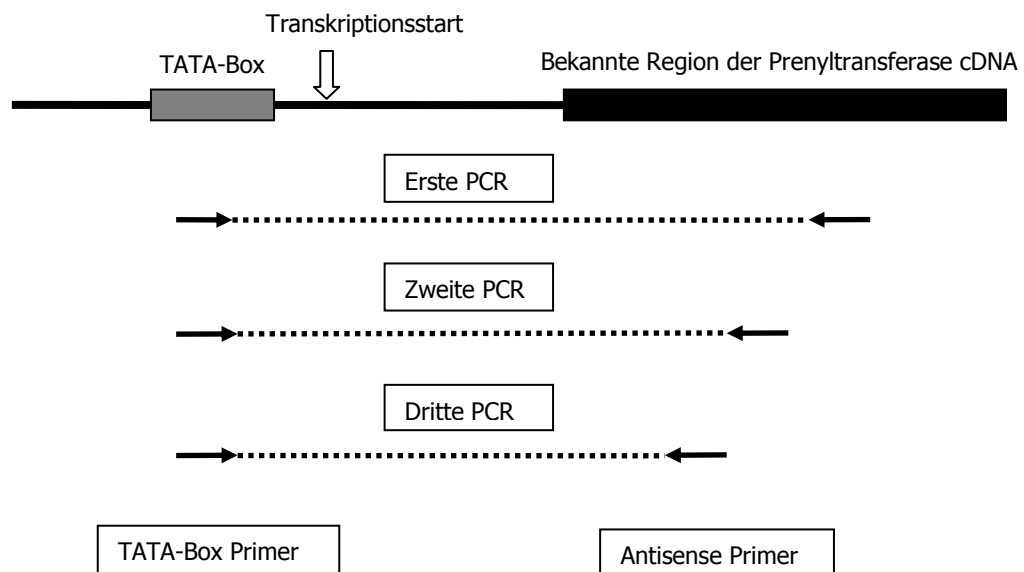


Abbildung 23: Schematische Darstellung der semi-nested TATA-BOX-PCR

6.2. SiteFinding-PCR

Als weitere Methode wurde eine Variante des Chromosome-Walking, die SiteFinding-PCR nach III.4.7.4 eingesetzt (Tan et al. 2005). Der Vorteil der Methode liegt darin, dass keine Sequenzinformationen über die 5'-Region, TATA-Box etc. vorliegen müssen, da eine zufällige Abfolge von 4 Nukleotiden an verschiedenen Punkten der genomischen DNA bindet und die Selektion über die Hybridisierung von Antisense-Primern erfolgt [Abbildung 24]. Anstelle der in der Grafik ersichtlichen NotI-Schnittstelle wurde hier eine NcoI-Schnittstelle eingebaut, da dieses Enzym in der Arbeitsgruppe vorrätig war.

Als genspezifische Primer wurden die unter II.2.1.2 genannten Antisense-Primer eingesetzt. Leider kam es hier nicht zur Bildung von PCR-Produkten.

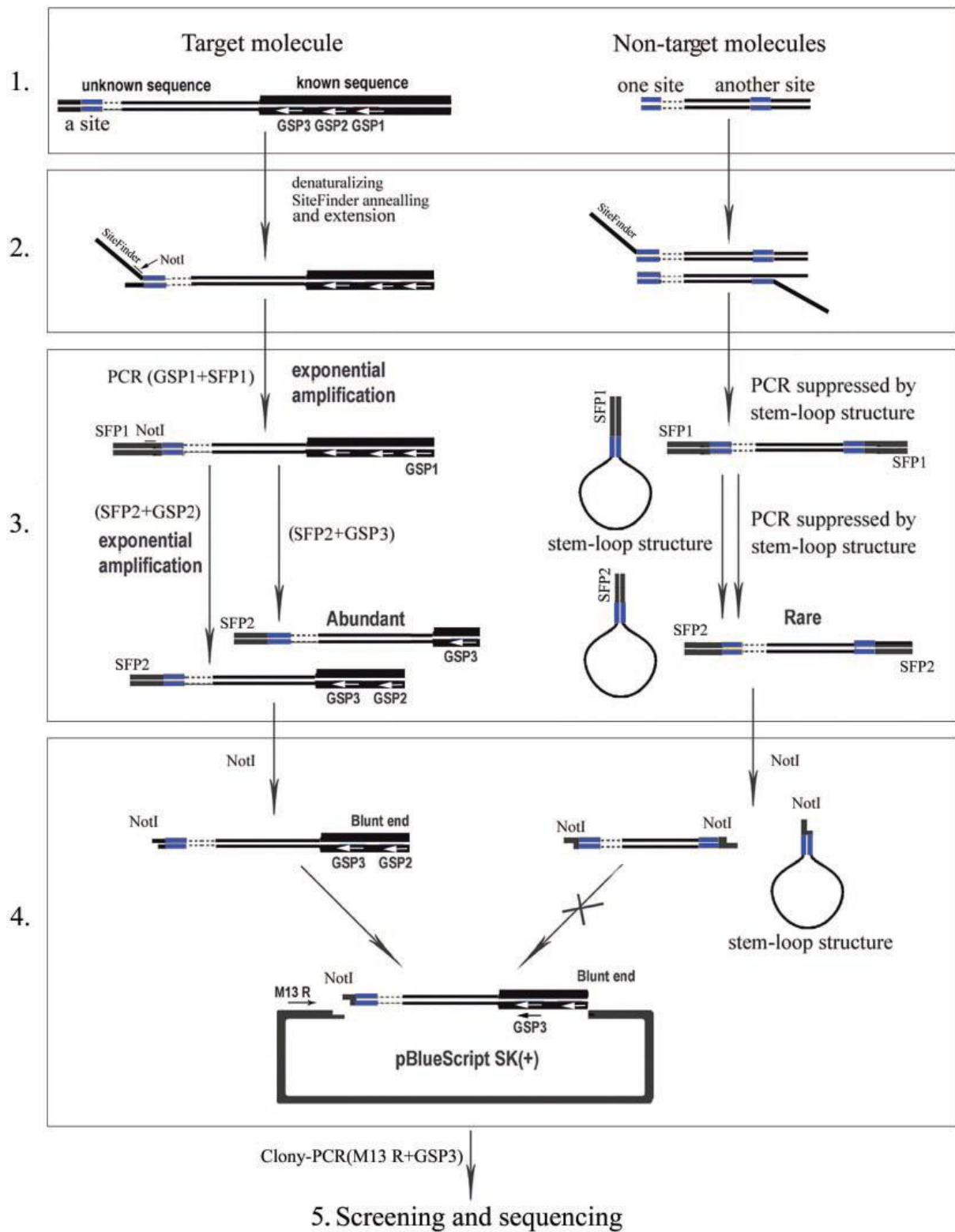


Abbildung 24: Schematische Darstellung der SiteFinding PCR nach (Tan et al. 2005)

6.3. Sequenzierung eines BAC-Klons

Ein weiterer Versuch wurde mit einem vom IPK (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research), Gatersleben, zur Verfügung gestellten BAC-Klon [II.1.3.3] unternommen. Wie die Isolierung eines gewünschten Klons aus einer gesamten BAC-Bank funktioniert ist in Abbildung 25 grob dargestellt. Als Probe für das Screening diente das unter 2.3 klonierte 400 bp PT-Fragment.

Screening a DNA library

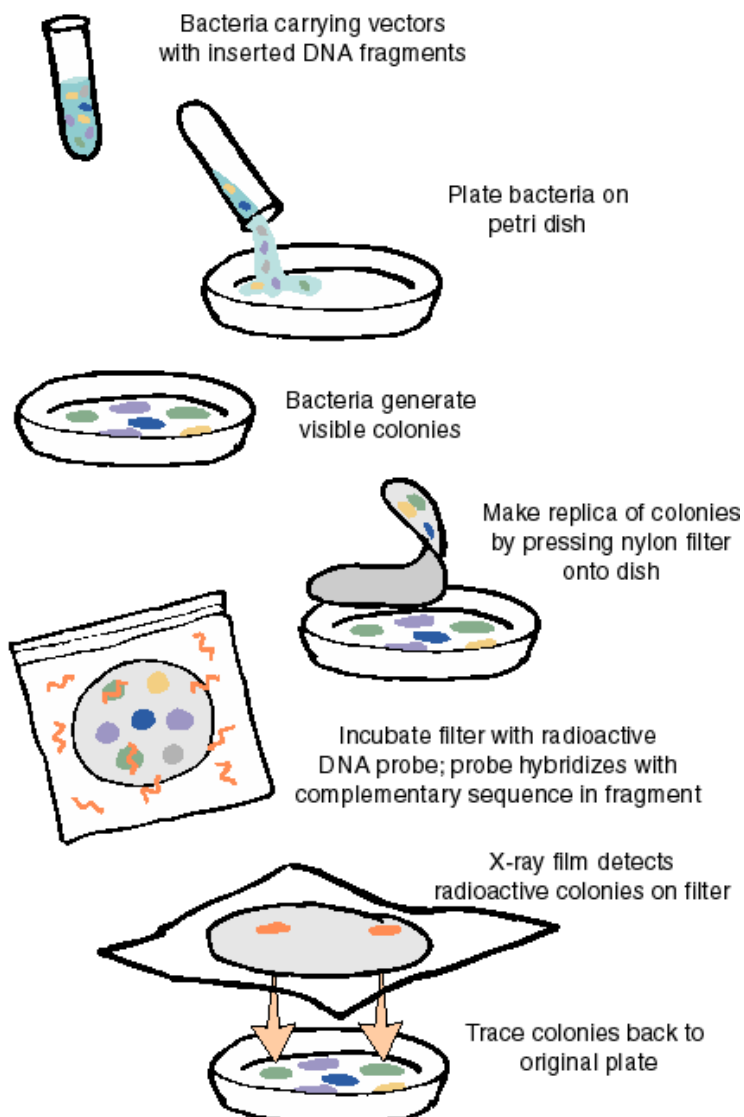


Abbildung 25: Screening einer BAC-Bibliothek

Zunächst wurde der mit dem PT-Fragment hybridisierende Klon vermehrt. Dazu wurde er nach III.4.12 in *E. coli* transformiert und auf Agarplatten plattiert, wonach die Vermehrung einzelner Kolonien in LB-Medium über Nacht erfolgte. Die Plasmide

wurden am nächsten Tag nach III.4.13 aufgereinigt und eine Insertionskontrolle schloss sich an [III.4.14]. Nach Quantifizierung wurde eine Sequenzierung des Klons angestrebt. Dabei kamen zwei Primer zum Einsatz, die an der T3 und T7 Promotorregion des pBluescript-Vektors binden [Abbildung 26]. Mit den herkömmlichen Sequenzierungsmethoden können pro Lauf nicht mehr als 1 kb sauber gelesen werden. Da die Insertgröße jedoch 5 kb betrug wurde zunächst an der T3 Promotorregion des Vektors sowie in Gegenrichtung an der T7 Promotoregion gestartet. Damit hätten bereits 2kb der 5kb langen Sequenz aufgeklärt werden können. Leider waren alle Versuche der Sequenzierung nicht erfolgreich. Nach längstens 200 bp war die Sequenz unsauber und nicht mehr lesbar. Auch Versuche, die Konzentration des Plasmids im Sequenzierungsansatz zu verringern oder zu erhöhen verbesserten das Sequenzierungsergebnis nicht.

Des Weiteren wurden PT-genspezifische Antisense-Primer als Sequenzierprimer eingesetzt, um die Sequenzier-Reaktion dort zu beginnen, wo die Sequenzinformationen von größtem Interesse war. Allerdings waren die Sequenzierungsergebnisse von Beginn an nicht lesbar, so dass keine neuen Informationen gewonnen werden konnten. Bei den genspezifischen Primern besteht wieder die Möglichkeit, dass die Primersequenz bei der genomischen DNA von einem Intron unterbrochen wird. Das Versagen der Sequenzierreaktion mit den Promotor-Primern könnte in einer schlechten Qualität des BAC-Klons begründet sein.

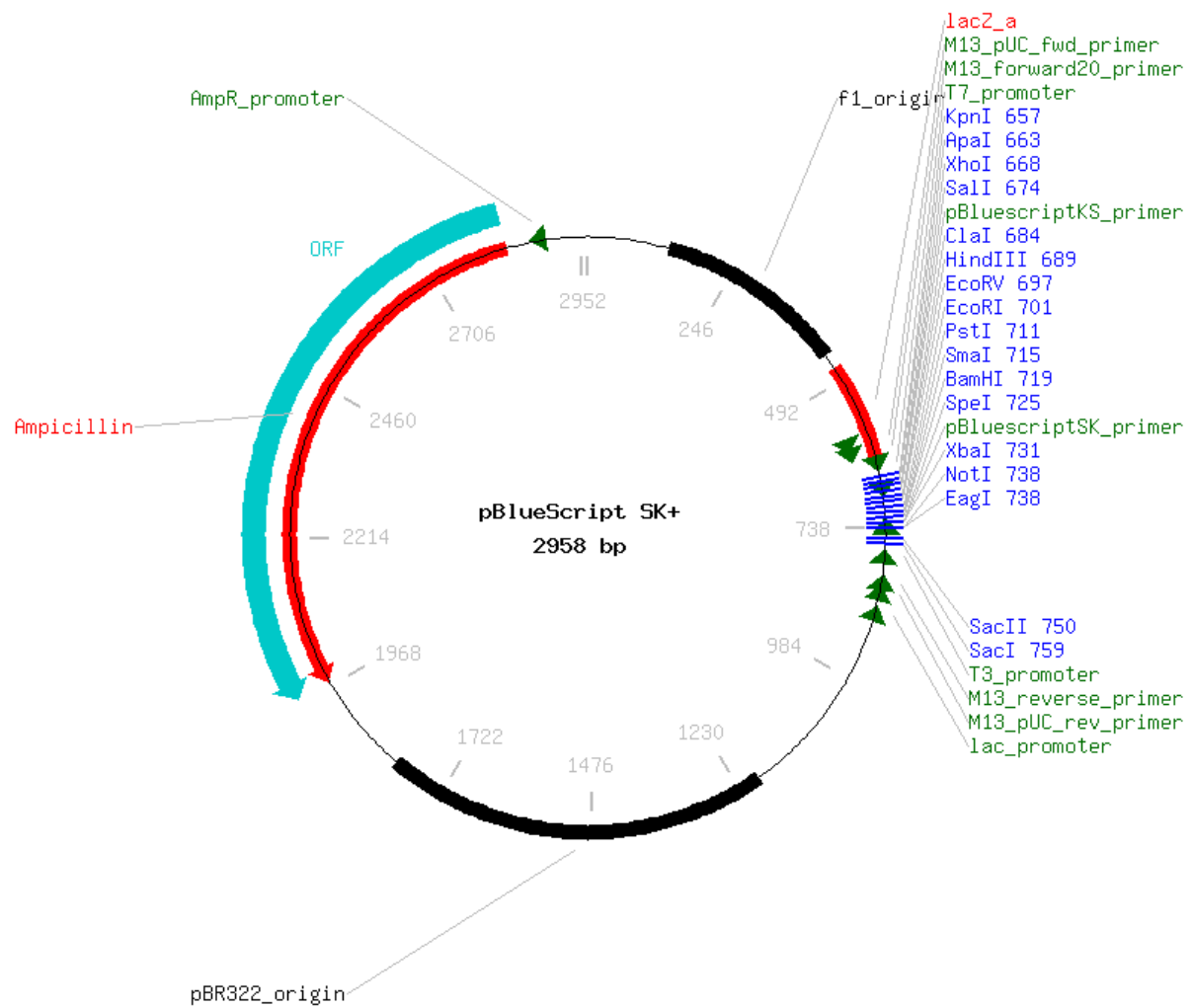


Abbildung 26: Vektor-Karte des pBluescript SK+ Vektors von Stratagene

7. Vorhersage von Transmembrandomänen

Mit den vorhandenen Sequenzinformationen wurde eine Vorhersage von Transmembran-Helices basierend auf dem Hidden-Markov-Modell (Krogh et al. 2001) durchgeführt [Abbildung 27]. Es ist zu erkennen, dass sich sechs potentielle Transmembrandomänen in der Aminosäuresequenz befinden. Die Membrandurchtritte sind durch sehr hydrophobe Sequenzabschnitte gekennzeichnet.

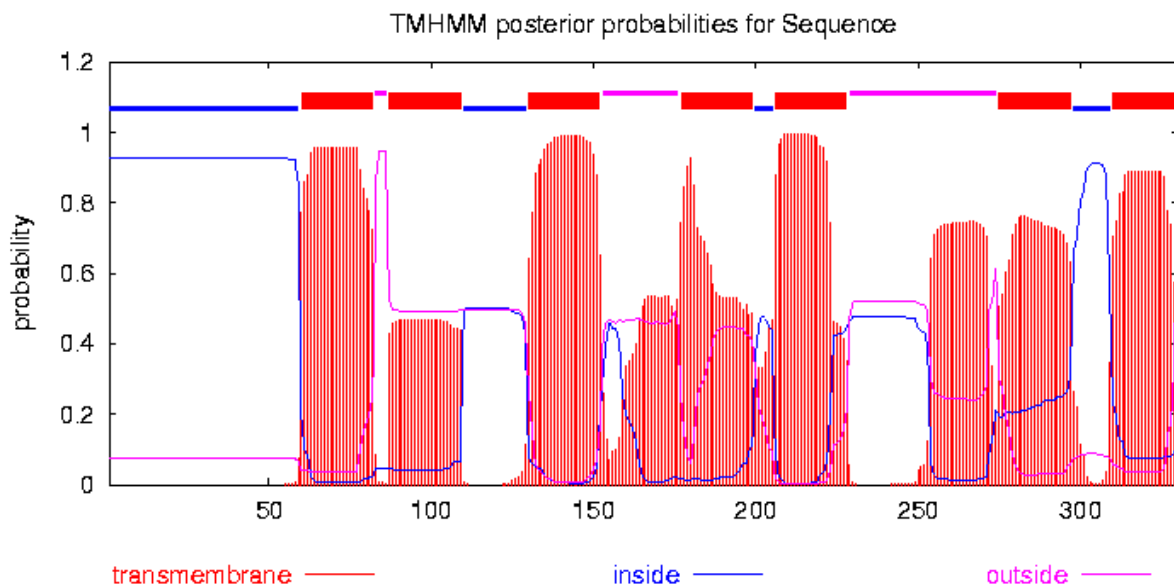


Abbildung 27: Voraussichtliche Transmembrandomänen in der bisherigen PT-Aminosäuresequenz

V. Diskussion

Hyperforin ist der quantitativ und qualitativ wichtigste Inhaltsstoff im Johanniskraut (Nahrstedt and Butterweck 1997, Soelberg et al. 2007). Die klinische Wirksamkeit alkoholischer Johanniskrautextrakte wurde in vielen Studien nachgewiesen und standardisierte Johanniskrautpräparate sind seit Jahren etablierte Therapeutika für die Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen (Barnes et al. 2001, Butterweck 2003, Butterweck et al. 2000, Butterweck and Schmidt 2007, Chatterjee et al. 1998, Linde et al. 2005). Die Anwendung könnte sich zukünftig auch auf schwere Depressionen ausweiten (Kasper et al. 2006).

Außerdem wurden dank intensiver Forschungsarbeit in den letzten Jahren andere Anwendungsgebiete erschlossen. So konnte eine starke Aktivität gegen Gram-positive Bakterienstämme gezeigt werden (Schempp et al. 1999). Desweiteren hemmt Hyperforin die Zyklooxygenase 1 (COX-1) und die 5-Lipoxygenase, wodurch die Bildung von Entzündungsmediatoren eingeschränkt wird. In der Behandlung entzündlicher Hauterkrankungen, wie dem atopischen Ekzem, wird diese Eigenschaft bereits nutzbringend angewendet. Insbesondere bei Kleinkindern kann immer häufiger auf die nebenwirkungsreiche Kortison-Behandlung verzichtet werden (C.M. Schempp 2000, Schempp et al. 2003).

Neuere Forschungsarbeiten zeigen, dass Hyperforin auch in die Krebstherapie Einzug halten könnte. Es hemmt das Wachstum vieler Tumorzelllinien durch apoptoseinduzierende Wirkung (Gartner et al. 2005, Hostanska et al. 2003, Quiney et al. 2006). Dabei fehlt jedoch die sonst für Krebstherapeutika übliche akute Toxizität. Zusätzlich könnte der antidepressive Effekt für Tumorpatienten, die bedingt durch ihren Zustand im Allgemeinen unter Angst und Depressionen leiden, äußerst nützliche Dienste leisten. Bislang verbietet sich der Einsatz von Johanniskrautpräparaten in Kombination mit den meisten Krebstherapeutika durch die enzyminduzierenden Nebenwirkungen.

Diese wurden bereits durch Aktivierung des Pregnan X-Rezeptors und Expressions- sowie Aktivitätsänderung des P-Glykoproteins erklärt und unterliegen weiterreichender intensiver Forschung (Godtel-Armbrust et al. 2007, Lee et al. 2006, Obach 2000, Wang et al. 2004, Wang et al. 2001, Weber et al. 2004).

Für einen umfassenden Einsatz in den genannten Gebieten wird die Nachfrage an isoliertem Hyperforin in den nächsten Jahren eventuell nicht mehr durch Anbau und Extraktion von *Hypericum perforatum* gedeckt werden können. Auch eine synthetische Darstellung ist aufgrund der Komplexität und Chiralität des Moleküls bislang nicht gelungen und selbst eine erfolgreiche Synthese wäre wohl mit hohen Kosten und niedrigen Ausbeuten verbunden. Daher stellt sich eine rekombinante Herstellung von Hyperforin als viel versprechende Alternative dar. Deren Realisierung macht es natürlich erforderlich zunächst die Biosynthese, die sich in weiten Teilen noch auf Hypothesen stützt, vollständig aufzuklären.

Als gesichert gilt, wie unter I.5 beschrieben, dass das Phloroglucin-Grundgerüst aus dem Polyketidstoffwechsel entsteht, wobei das aus Valin gebildete Isobutyryl-CoA als Startersubstrat fungiert (Adam et al. 2002, Karppinen et al. 2007). Dieses wird von der Isobutyrophenonsynthase (BUS), einer Typ III Polyketidsynthase, unter Bildung eines linearen Intermediats mit drei Molekülen Malonyl-CoA und anschließender intramolekularer Claisen-Kondensation zum Phlorisobutyrophenon kondensiert (Klingauf et al. 2005) [Abbildung 28].

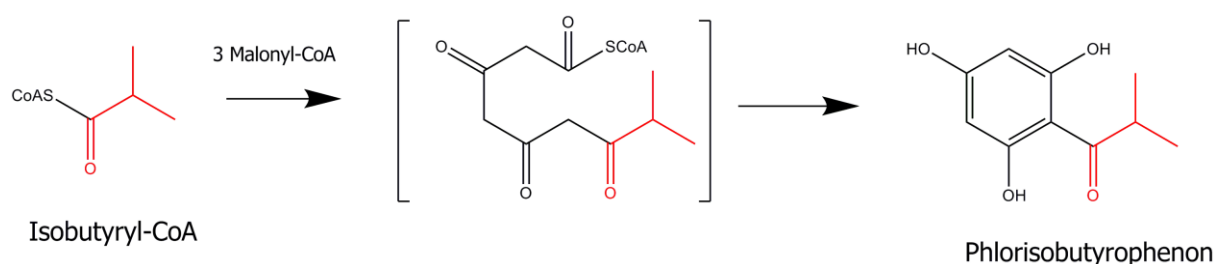


Abbildung 28: Bildung des Hyperforingrundgerüsts

Die fünf Isopreneinheiten zur anschließenden Prenylierung werden, wie (Adam et al. 2002) zeigen konnten, hauptsächlich durch den erst vor einigen Jahren entdeckten Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg) in den Plastiden gebildet (Rohmer 1999). Dieser ist in Abbildung 29 dargestellt.

Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) werden über die Deoxyxylulosephosphat-Synthase (DXS) zu 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DXP) verknüpft. DXP wird dann durch die DXP-Reduktase (DXR) zu 2-C-Methyl-D-

Erythritol-4-Phosphat (MEP) reduziert. MEP wird, katalysiert durch die Cytidindiphosphat-Methylerythritol-Synthase (CMS), mit CTP (Cytrintriphosphat) aktiviert. Es entsteht 4-Phosphocytidyl-2-*C*-Methyl-D-Erythritol (CDP-ME), welches durch ATP und die Cytidyl-Methyl-Kinase (CMK) zu 4-Diphosphocytidyl-2-*C*-Methyl-D-Erythritol-2-P (CDP-MEP) phosphoryliert wird. Bei der folgenden Zyklisierung entsteht unter Abspaltung von Cytidinmonophosphat (CMP) ein Phosphorsäureester zwischen C2 und C4. Die Reaktion wird durch die Methyl-Erythritol-Cyclo-Diphosphat-Synthase (MCS) katalysiert, es entsteht 2-*C*-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat (ME-cPP). Die Hydroxy-Methyl-Butenyl-Diphosphat-Synthase (HDS) katalysiert dann die Umsetzung zu (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyldiphosphat (HMBPP). Die IPP/DMAPP-Synthase (IDS) katalysiert im letzten Schritt die Umsetzung zu IPP und DMAPP im Verhältnis 5:1.

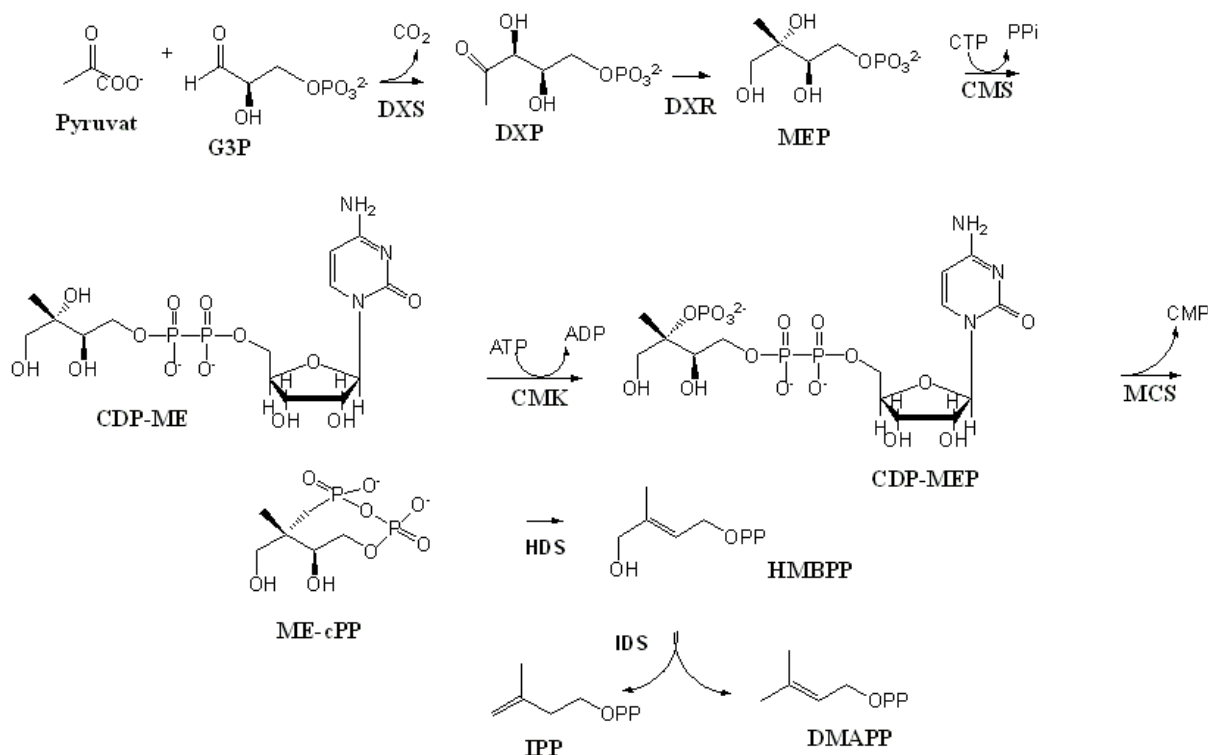


Abbildung 29: Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg

Die so gebildeten Isopreneinheiten werden dann durch elektrophile Substitution des Hyperforin-Grundgerüsts eingeführt. Dabei wird zunächst eine Isoprengruppe vom DMAPP, dem Prenyldonor, auf die Position C4 des Phlorisobutyrophenons, des

Prenylakzeptors, übertragen. Dieser Schritt konnte mit zellfreien Extrakten aus *Hypericum calycinum*-Zellkulturen von (Boubakir et al. 2005) gezeigt werden und wurde im Rahmen dieser Arbeit auch mit Extrakten aus *Hypericum perforatum*-Sprosskulturen nachgewiesen [IV.1].

Der weitere Ablauf der Biosynthese wurde von (Beerhues 2006) vorgeschlagen [Abbildung 30]. Die zweite Prenylierung erfolgt analog der ersten an C6. Daran schließt sich die dritte elektrophile Substitution des nun zweifach prenylierten Grundkörpers ebenfalls an Position C6 an. Als Elektrophil dient nun Geranylpyrophosphat (GPP), wobei die Bindung der C₁₀-Kette nur unter Aufhebung des aromatischen Zustandes vollzogen werden kann. Durch elektrophilen Angriff an der 2'/3'-Doppelbindung des eingeführten Geranylrestes durch ein drittes Molekül DMAPP kommt es zur Ausbildung des bizyklischen Hyperforins.

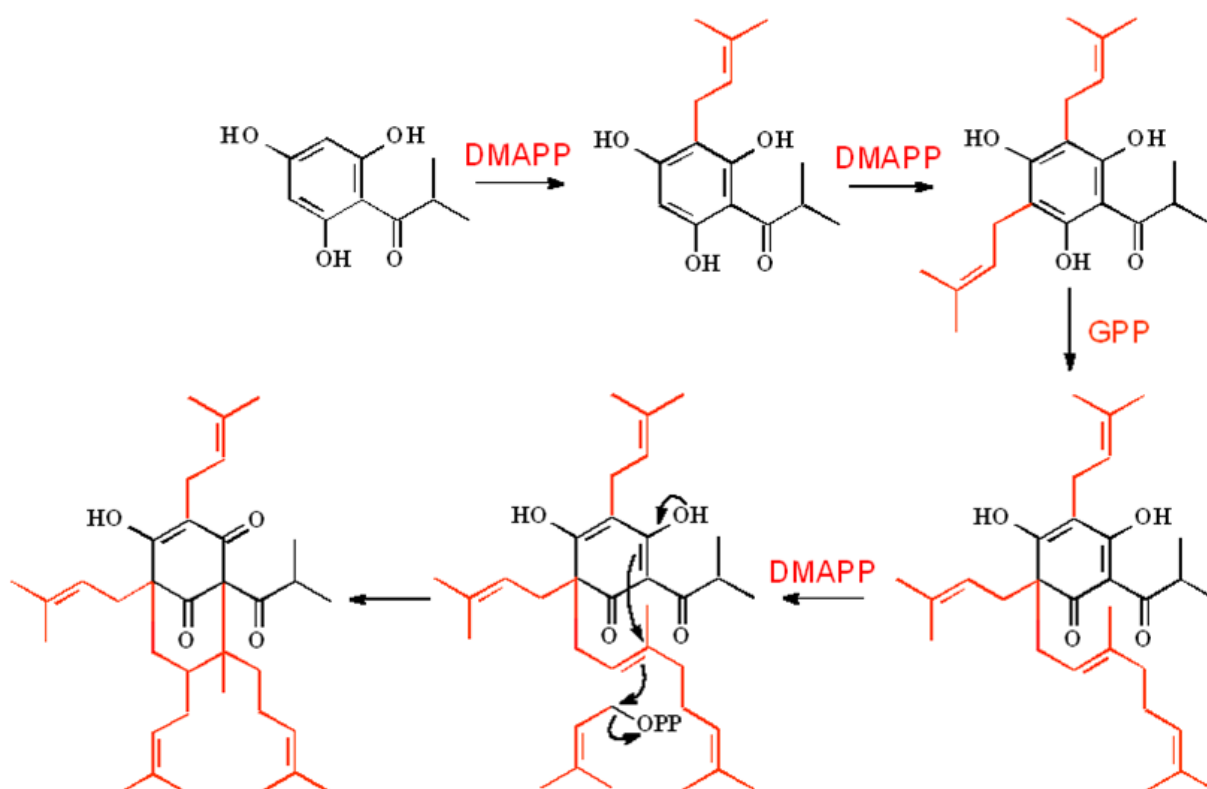
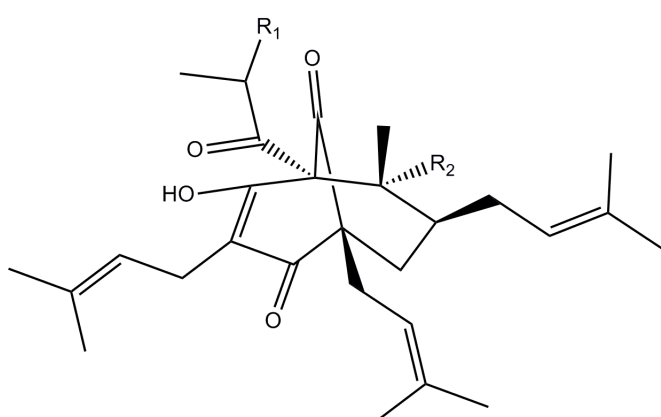


Abbildung 30: Vorgeschlagener Ablauf der Hyperforinbiosynthese (Beerhues 2006)

Außer Hyperforin wird auf diesem Weg wahrscheinlich auch Adhyperforin als Homolog gebildet [Abbildung 31], welches ebenfalls in *Hypericum perforatum*-

Pflanzen gefunden wurde (Maisenbacher and Kovar 1992). Als Startersubstrat dient hier statt des Isobutyryl-CoAs das 2-Methylbutyryl-CoA. Außerdem wurde in Sprosskulturen von *H. perforatum*, die mit dem Phytohormon Naphtylelessigsäure (NAA) behandelt wurden, Secohyperforin [Abbildung 31] als neues Homologes zu Hyperforin nachgewiesen (Charchoglyan et al. 2007). Strukturell unterscheidet sich Secohyperforin durch das Fehlen einer Isopreneinheit, was durch Angriff eines DMAPP statt des GPP auf den zweifach prenylierten Grundkörper erklärt werden kann.



	R₁	R₂
Hyperforin	CH ₃	Isopren
Adhyperforin	CH ₂ -CH ₃	Isopren
Secohyperforin	CH ₃	CH ₃
Adsecohyperforin	CH ₂ -CH ₃	CH ₃

Abbildung 31: Hyperforin und Homologe

Der Übertrag der Isopreneinheiten bei der Hyperforinbiosynthese wird von Prenyltransferasen katalysiert. Sie gehören zu einer sehr großen und wenig homogenen Enzymfamilie, die sich in den letzten Jahren durch immer neue Erkenntnisse ständig erweitert hat. Eine Einteilung in sich weiter verzweigende Subfamilien kann aufgrund verschiedenster Charakteristika erfolgen.

Abbildung 32 zeigt ein Schema, nach dem die Prenyltransferasen im Folgenden besprochen werden.

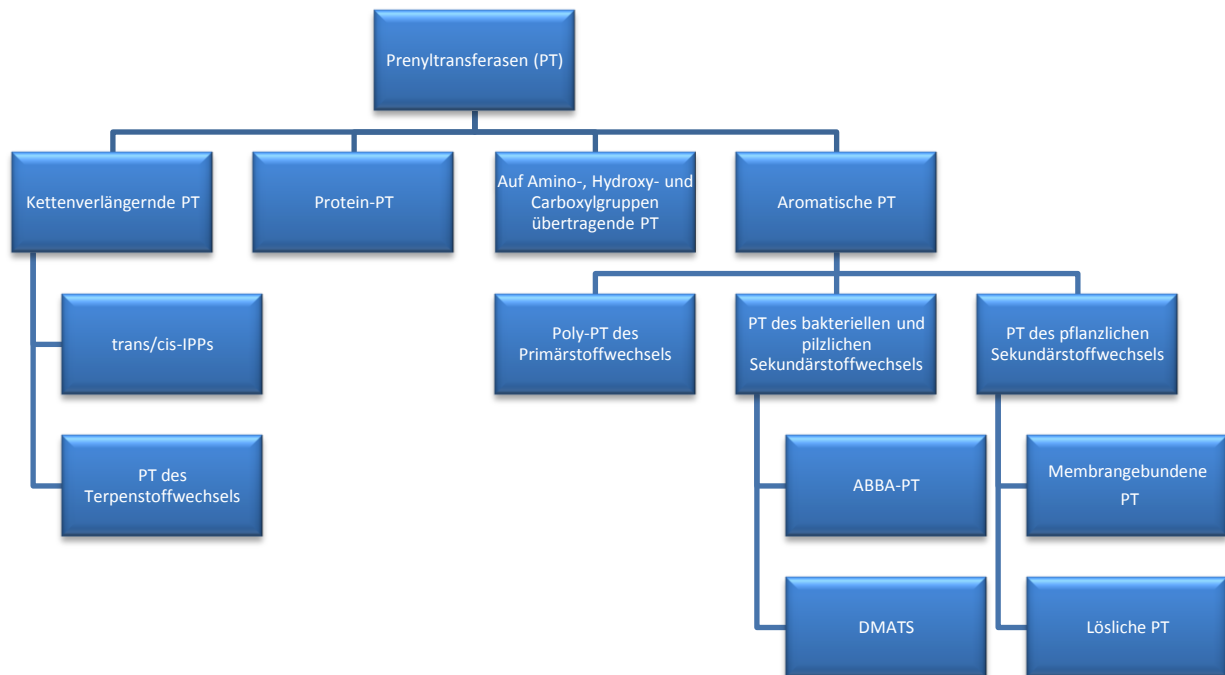


Abbildung 32: Einteilung von Prenyltransferasen

Als Prototyp dieser Familie gilt die kettenverlängernde *trans*-Farnesyl-Diphosphatsynthase (FPPS) des Primärstoffwechsels (Poulter 2006). Isopentylidiphosphat (IPP) wird durch zwei aufeinander folgende 1'-4 Verknüpfungen mit Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) bzw. Geranylpyrophosphat (GPP) zum Farnesylpyrophosphat (FPP) kondensiert. Die Reaktion erfolgt durch Abspaltung der Diphosphatgruppe an C-1 des Prenyldonors, woran sich ein elektrophiler Angriff an die 3,4-Doppelbindung des IPP anschließt. Es kommt zur Bildung eines Carbokations an C-3 des Intermediats. Durch Elimination eines Protons an C-2 kommt es schließlich zur *trans* 2,3-Doppelbindung (Poulter and Rilling 1978) [Abbildung 33].

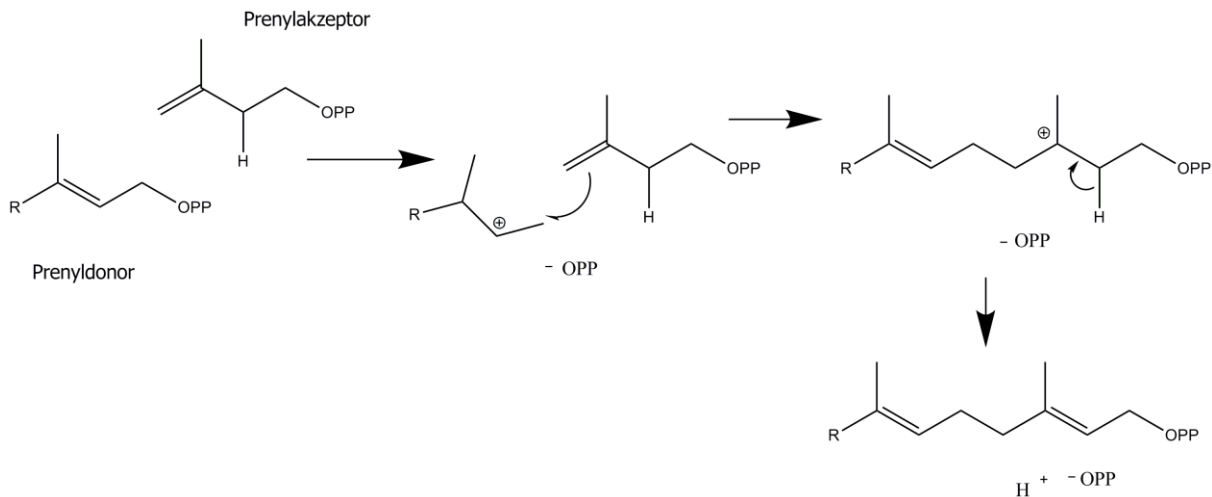


Abbildung 33: Mechanismus der Kettenverlängerung

Das so über GPP entstandene FPP ist die Vorstufe der in allen Eukarya vorkommenden Membransterole. Sehr ähnliche Reaktionen findet man auch bei anderen *trans*-Polyprenyldiphosphat-Synthasen. Sie katalysieren zum Beispiel die Bildung von Geranylgeranylpyrophosphat in Pflanzen, welches die Vorstufe von Carotinoiden darstellt. Außerdem werden auch die Seitenketten von Ubichinonen, Menachinonen und Plastochinonen auf diesem Weg gebildet.

Es wurden bereits viele *trans*-Isoprenyldiphosphat-Synthasen (*trans*-IPPS) gereinigt und klassifiziert sowie die entsprechenden Gene kloniert und zugehörige Röntgenkristallstrukturen aufgeklärt (Ogura et al. 1997, Tarshis et al. 1996). Betrachtet man multiple Sequenzvergleiche verschiedener *trans*-IPPS, zeichnen sich zwei N/DDxxD-Motive ab, welche an der Mg²⁺-vermittelten Komplexierung der jeweiligen Substrate beteiligt sind.

Bei *cis*-IPPs, wie zum Beispiel der Undecaprenyldiphosphat-Synthase aus *E. coli*, welche die Bildung von Bactoprenol, einem Lipidcarrier für die Biosynthese von Peptidoglykan katalysiert, fehlen diese Motive (Guo et al. 2005). Die Reaktion ist aber ebenfalls Mg²⁺-abhängig (Lu et al. 2009).

Eine weitere große Gruppe von Prenyltransferasen ist im Sekundärstoffwechsel an der Bildung von Terpenen beteiligt. Je nach Anzahl der eingebauten Isopreneinheiten kommt es zu Hemi-, Mono-, Sesqui- und Di- bis hin zu Polyterpenen. Es wurden vier verschiedene Möglichkeiten der C-C Verknüpfung gefunden (Thulasiram et al. 2007). Daran schließen sich Umlagerungen und komplexe Zyklisierungsmechnismen an,

woraus eine enorme Vielfalt von zehntausenden Verbindungen resultiert (O'Maille et al. 2008) [Abbildung 34].

Die Gruppe der Monoterpen-Synthasen nutzt GPP als Substrat, wohingegen Sesquiterpen-Synthasen FPP und Diterpen-Synthasen GGPP umsetzen. Alle derzeit untersuchten Terpensynthasen verfügen über ein Aspartat-reiches Sequenzmotiv, welches aber nicht zwingend dem Typ N/DDxxD entsprechen muss. Die Komplexierung des Substrats wird über bivalente Metallionen wie Mg^{2+} und Mn^{2+} vermittelt (Christianson 2008).

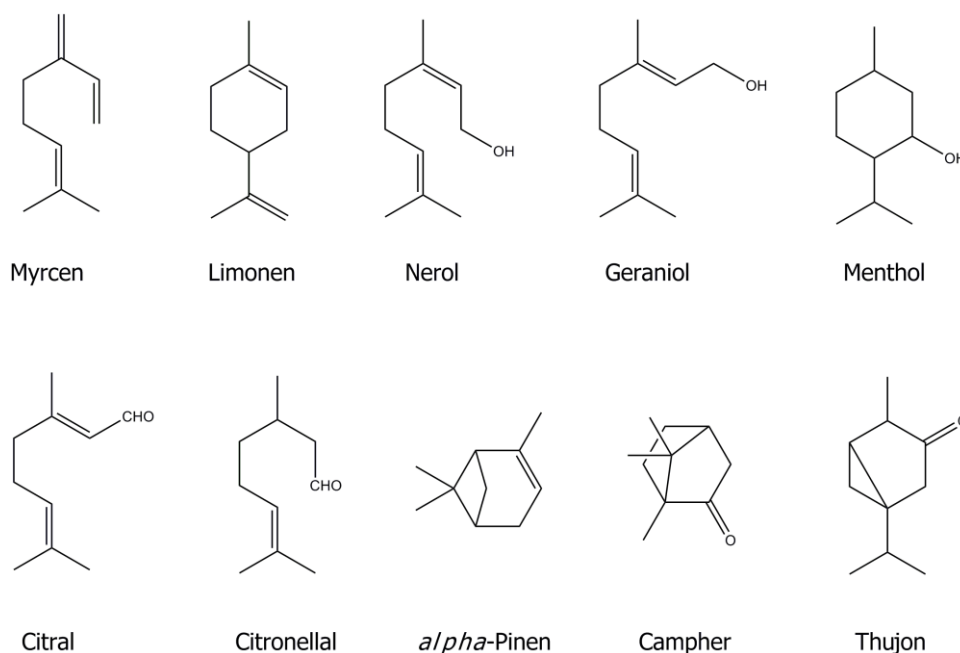


Abbildung 34: Strukturen einiger Monoterpene

Protein-Prenyltransferasen spielen eine wichtige Rolle bei der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen, indem sie einen Isoprenrest auf ein Protein bzw. auf ein Peptid transferieren. Dabei stellen Thiolgruppen von Cysteinen den nukleophilen Teil des Prenylakzeptors dar und im Vergleich zu anderen Prenyltransferasen wird keine C-C-Bindung geknüpft, sondern eine C-S-Bindung. Es werden entweder Farnesylgruppen oder Geranylgeranylgruppen übertragen (Maurer-Stroh et al. 2003). Protein-Prenyltransferasen verfügen nicht über ein charakteristisches N/DDxxD-Motiv und die Aktivierung des Oligoprenyldiphosphats wird über Zn^{2+} -Ionen vermittelt. Die

Erkennung der Substrate erfolgt zum Beispiel bei der Ras-Farnesyltransferase über ein C-terminales CAAx-Motiv (Long et al. 2002).

Andere Prenyltransferasen übertragen Isopreneinheiten auf Amino-, Carboxyl- oder Hydroxygruppen. So zum Beispiel die ATP/ADP Isopentenyl Transferasen (IPTs) oder die tRNA-IPTs, die in der Zytokinin-Biosynthese eine Rolle spielen (Miyawaki et al. 2006). In Pflanzen findet man außerdem prenylübertragende Chlorophyllsynthasen (Lopez et al. 1996). Desweiteren wurde schon die Kristallstruktur einer Glycerol-1-Phosphat Prenyltransferase aus *Archaeoglobus fulgidus* aufgeklärt (Payandeh et al. 2006).

Schließlich können Prenyltransferasen auch Isopreneinheiten auf aromatische Akzeptormoleküle übertragen. Durch diese Verknüpfungen entsteht eine enorme Vielfalt an pflanzlichen, bakteriellen und pilzlichen Sekundärstoffen.

Im Primärstoffwechsel katalysieren aromatische Polyprenyltransferasen die Übertragung der von den *trans*-IPPs gebildeten Polyprenyl-Ketten auf 4-Hydroxybenzoat (4HB), 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoat (DHNA) und Homogentisat (HGA) zur Synthese von Ubichinonen, Menachinonen bzw. Plastochinonen [Abbildung 35] (Heide 2009). Pflanzliche *para*-Hydroxybenzoat Polyprenyltransferasen (PPTs) wurden zum Beispiel aus *Arabidopsis thaliana* (AtPPT1) und *Oryza sativa* (OsPPT1) kloniert und funktionell charakterisiert (Ohara et al. 2006, Okada et al. 2004).

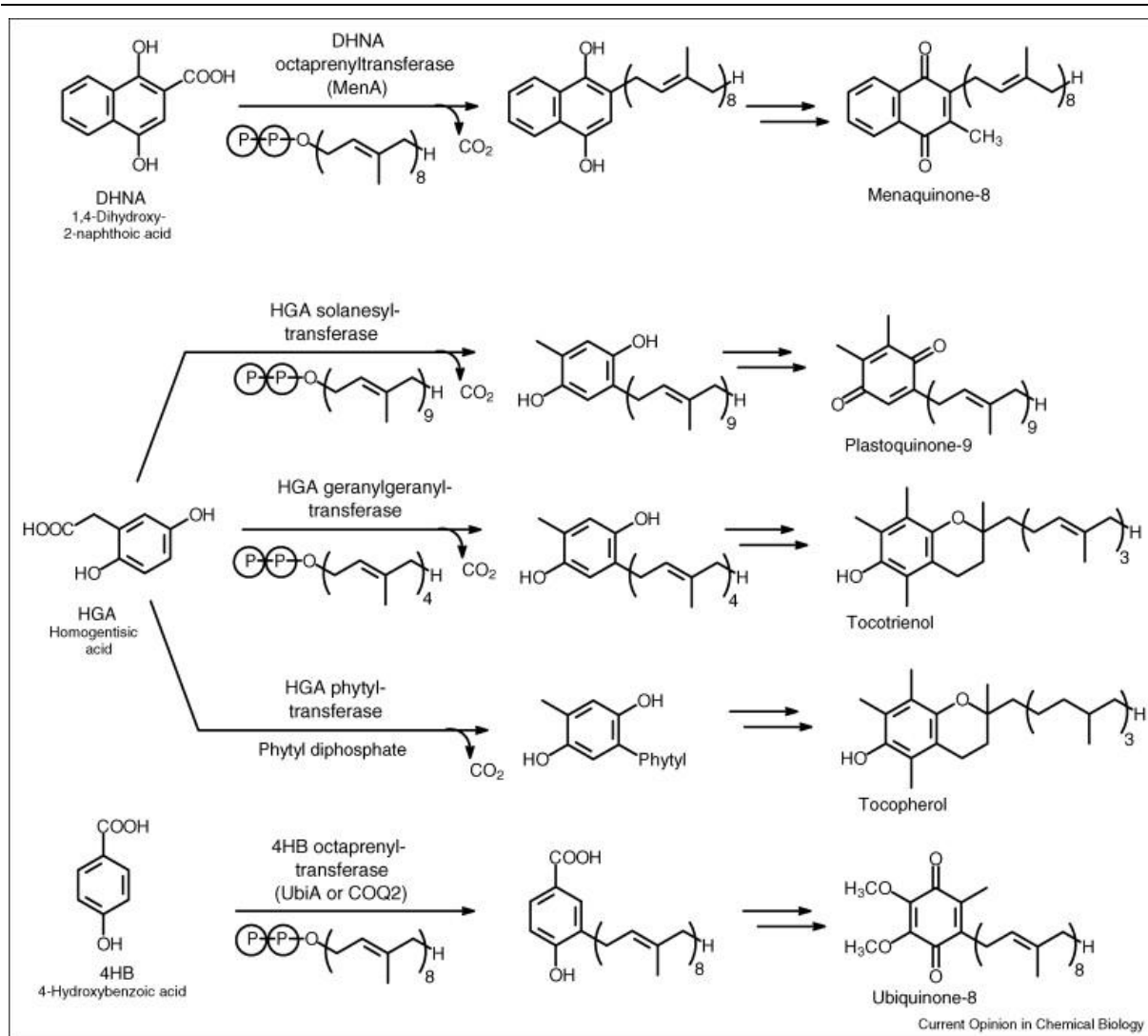
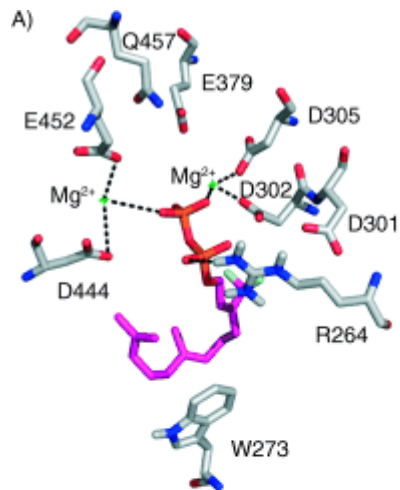


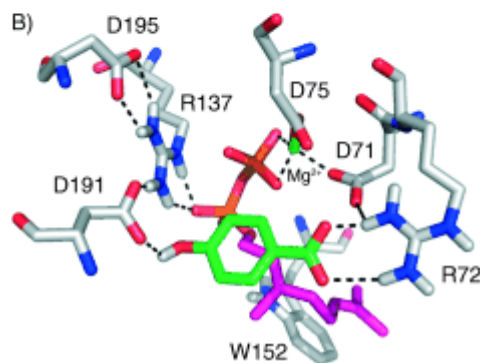
Abbildung 35: Reaktionen von Polyprenyltransferasen (Heide 2009)

PPTs sind integrale Membranproteine, die in Bezug auf den Prenyldonor eine breite Substratspezifität aufweisen. Abgesehen von DMAPP akzeptieren sie fast alle *trans*-verknüpften Prenylreste. In der Aminosäuresequenz findet sich, ähnlich wie bei den *trans*-IPPs, ein aspartatreiches Motiv. Die Reaktion ist abhängig von Mg^{2+} oder der Gegenwart anderer zweiwertiger Kationen wie Mn^{2+} , Co^{2+} oder Ni^{2+} . Es konnte noch keine Protein-Kristallstruktur aufgeklärt werden, allerdings wurde kürzlich ein Modell der *para*-Hydroxybenzoat Polyprenyltransferase UbiA aus *E. coli* veröffentlicht (Bräuer et al. 2008). Abbildung 36 zeigt das aktive Zentrum mit Substraten.



A)

Aktives Zentrum der Modellvorlage:
Röntgenkristallstruktur der 5-Epi-
Aristolochen Synthase mit
Trifluorofarnesyldiphosphat als Ligand



B)

Aktives Zentrum des UbiA-Modells mit
p-Hydroxybenzoat (grün) und
Geranylpyrophosphat (magenta)

Abbildung 36: Modell des aktiven Zentrums der UbiA (Bräuer et al. 2008)

Eine ganz neue Familie aromatischer Prenyltransferasen wurde in Chlorobiocin produzierenden Bakterien der Gattung *Streptomyces* entdeckt. Die Chlorobiocin-Biosynthese beinhaltet die Prenylierung von *para*-Hydroxybenzoat mit DMAPP. Die katalysierende Prenyltransferase (CloQ) ist löslich und enthält kein DDxxD Motiv. Ferner ist die Reaktion nicht abhängig von zweiwertigen Kationen (Pojer et al. 2003). Anhand von Homologievergleichen wurden weitere Prenyltransferasen dieses Typs kloniert und überexprimiert und es gelang die Röntgenkristallstruktur von NphB aufzuklären (Haagen et al. 2007, Kuzuyama et al. 2005, Tello et al. 2008). Aufgrund der α - β - β - α Faltung des Proteins wurde die Familie ABBA genannt. Die katalysierten Reaktionen sind in Abbildung 37 dargestellt. Die Prenylierung von Flaviolin fand dabei nicht über das C-1 des GPP statt, sondern das C-3. Man spricht hier von reverser Prenylierung. Die Reaktion von NphB ist als einzige Mg^{2+} -abhängig, aber es wird vermutet, dass positiv geladene Lysin- oder Arginin-Reste in den anderen Proteinen eine ähnliche Funktion erfüllen. Trotz des Fehlens einer spezifischen aspartatreichen

Region ist doch ein Aspartatrest im aktiven Zentrum des Proteins an der Reaktion beteiligt. So scheint es trotz der vollständig anderen Struktur dennoch einige Eigenschaften zu geben, die allen Prenyltransferasen gemein sind.

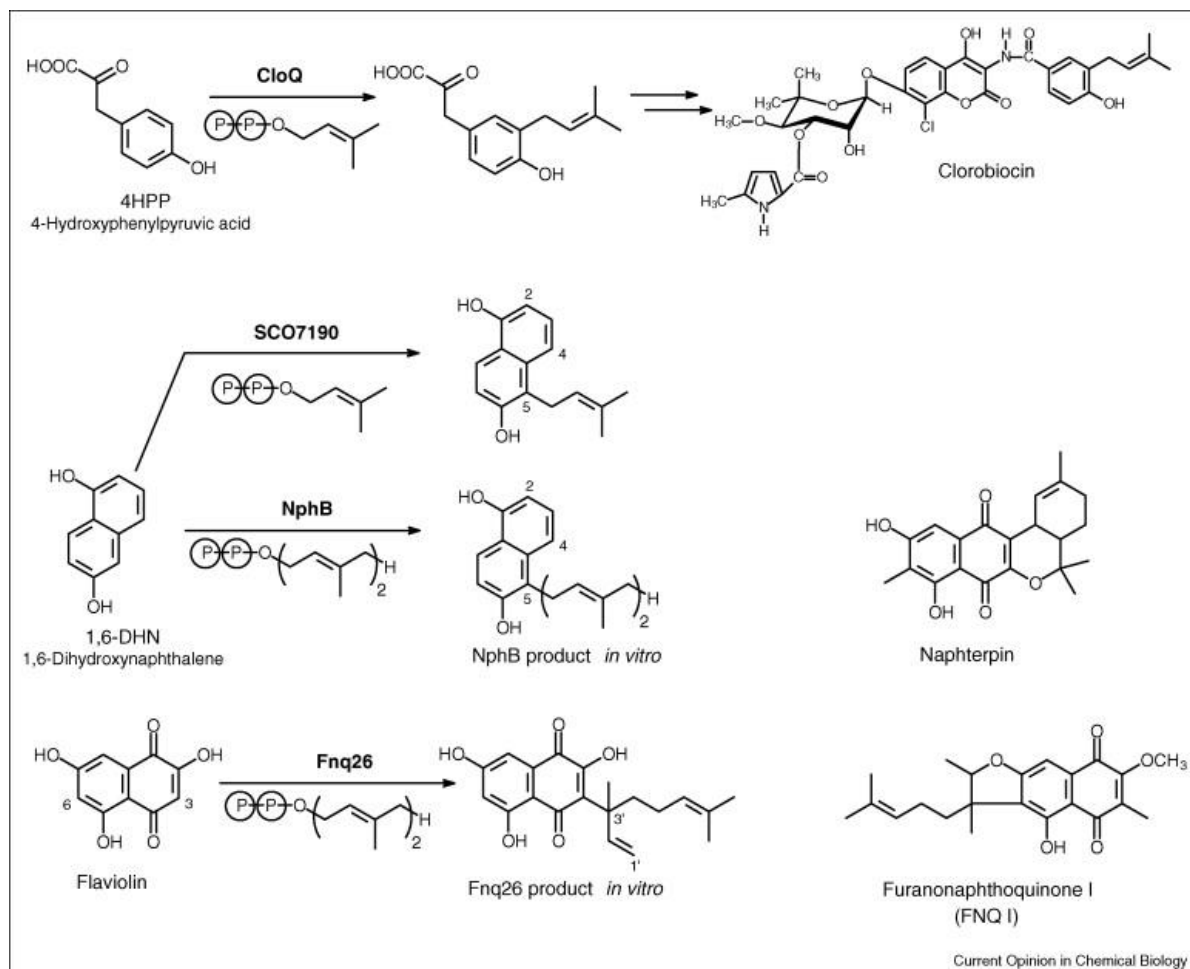


Abbildung 37: Reaktionen von ABBA Prenyltransferasen (Heide 2009)

Im Genom von Pilzen wurden ebenfalls schon vier Gene identifiziert, die große Ähnlichkeit zur ABBA Familie aufweisen (Tello et al. 2008).

Desweiteren spielt die Prenylierung von Indol-Gerüsten bei der Alkaloidbiosynthese eine wichtige Rolle (Williams et al. 2000). Als erstes wurde die an der Biosynthese der Ergot-Alkaloide beteiligte Dimethylallyltryptophan-Synthase (DMATS) überexprimiert (Tsai et al. 1995). Anhand von Homologievergleichen konnten aus dem Genom von *Aspergillus fumigatus* mehrere ähnliche Enzyme kloniert, überexprimiert und charakterisiert werden (Kremer and Li 2008). Die katalysierten

Reaktionen sind in Abbildung 38 dargestellt. Auch weitere ähnliche Prenyltransferasen aus anderen Pilzen konnten identifiziert werden (Balibar et al. 2007, Young et al. 2006). Die Reaktionen sind unabhängig von zweiwertigen Kationen und in der Aminosäuresequenz der löslichen Enzyme findet sich kein DxxD Motiv, aber auch keine Ähnlichkeit zu den ABBA-Sequenzen. Es wird ausschließlich DMAPP als Prenyldonor akzeptiert, allerdings kommt es sowohl zu C- als auch zu N-Prenylierungen des Indols. Bislang wurde noch keine erfolgreiche Proteinkristallisation publiziert.

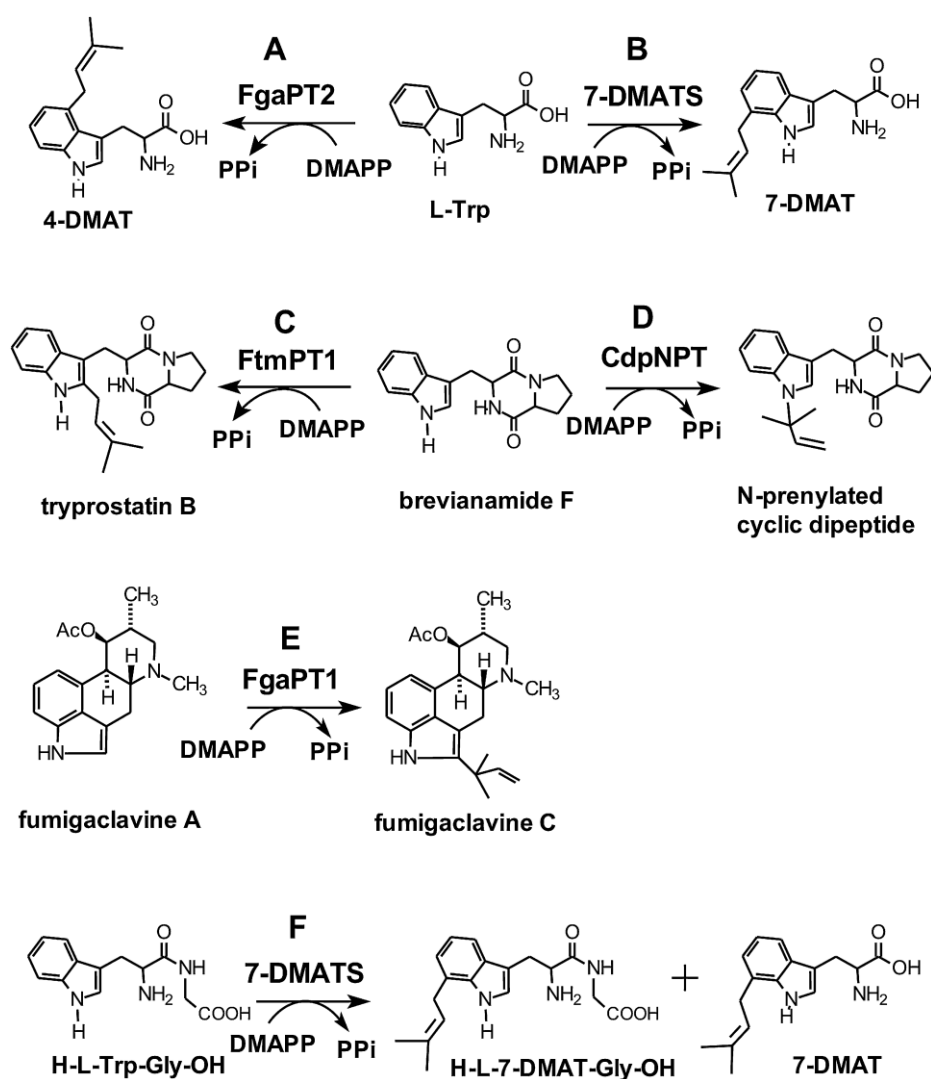


Abbildung 38: Von Prenyltransferasen aus *Aspergillus fumigatus* katalysierte Reaktionen (Kremer and Li 2008)

Auf die Existenz einer weiteren neuen Familie von Prenyltransferasen deutet die Arbeit von (Edwards and Gerwick 2004) hin. Die an der Biosynthese von Lyngbya-Toxinen aus dem Cyanobakterium *Lyngbya majuscula* beteiligten Prenyltransferasen weisen keine strukturelle Ähnlichkeit mit den oben genannten auf.

Lange Zeit scheiterten alle Versuche aromatische Prenyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels aufzureinigen oder die entsprechenden cDNAs zu klonieren. Schließlich gelang (Yazaki et al. 2002) der erste Erfolg. Aus *Lithospermum erythrorhizon* wurden zwei cDNAs kloniert, deren korrespondierende Enzyme (*LePGT1* und *LePGT2*) die Prenylierung von 4-Hydroxybenzoat in der Biosynthese des Naphtochinonderivats Shikonin katalysieren. Anwendung fand die Methode der Homologieklonierung. Als Vorlage für degenerierte Primer diente ein Vergleich bereits bekannter eukaryontischer Polyprenyltransferasen. Die Enzyme zeigen eine sehr große Ähnlichkeit mit den aromatischen Polyprenyltransferasen des Ubichinonstoffwechsels, unterscheiden sich aber funktionell darin, dass sie ausschließlich GPP umsetzen [Abbildung 39]. Es konnte gezeigt werden, dass sie in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert sind. Die Polyprenyltransferasen des Primärstoffwechsels dagegen sind in der Mitochondrienmembran zu finden. Die Aminosäuresequenzen enthalten ein typisches NDxxD Motiv und die Reaktionen sind abhängig von zweiwertigen Kationen wie z.B. Mg^{2+} .

Der nächste Durchbruch gelang (Sasaki et al. 2008) mit der Identifizierung des Naringenin-8-Dimethylallyltransferase-Gens (*SfN8DT-1*) aus *Sophora flavescens*. Eine cDNA-Bibliothek wurde aus mit Hefeextrakt-elizitierten Zellkulturen gewonnen und circa 12000 EST-Klone wurden sequenziert und anschließend nach drei Kriterien gemustert. Da Flavonoidprenyltransferasen in den Plastiden lokalisiert zu sein scheinen (Zhao et al. 2003) wurde nach plastidären Transitpeptiden und außerdem nach putativen Transmembrandomänen und dem verantwortlichen aspartatreichen Motiv für die Mg^{2+} -vermittelte Prenylpyrophosphat-Bindung gesucht. Sieben Klone erfüllten alle Kriterien und wurden überexprimiert. Prenyltransferaseaktivität wurde in einem der Klone gefunden. Das Enzym katalysiert die erste Prenylierung von Naringenin, welches in einem zweiten Prenylierungsschritt zum Sophoraflavanone G

(SFG) umgesetzt wird [Abbildung 39]. Somit ist dieses die erste klonierte und charakterisierte Prenyltransferase, die in die Flavonoidbiosynthese involviert ist.

Basierend auf den Erkenntnissen über *Sophora flavescens* konnte kürzlich als dritte pflanzliche Prenyltransferase die Glycinol-4-dimethylallyltransferase (G4DT) kloniert und charakterisiert werden (Akashi et al. 2009). Sie katalysiert die Prenylierung von Glycinol in der Biosynthese von Glyceollinen, den Phytoalexinen in Soja (*Glycine max*) [Abbildung 39]. Das Enzym ist ebenfalls membrangebunden, abhängig von Mg^{2+} als Cofaktor und enthält das aspartatreiche Motiv NQxxDxxxD.

Dank dieser geleisteten Vorarbeit ist davon auszugehen, dass zukünftig Prenyltransferasen dieser Familie vermehrt publiziert werden.

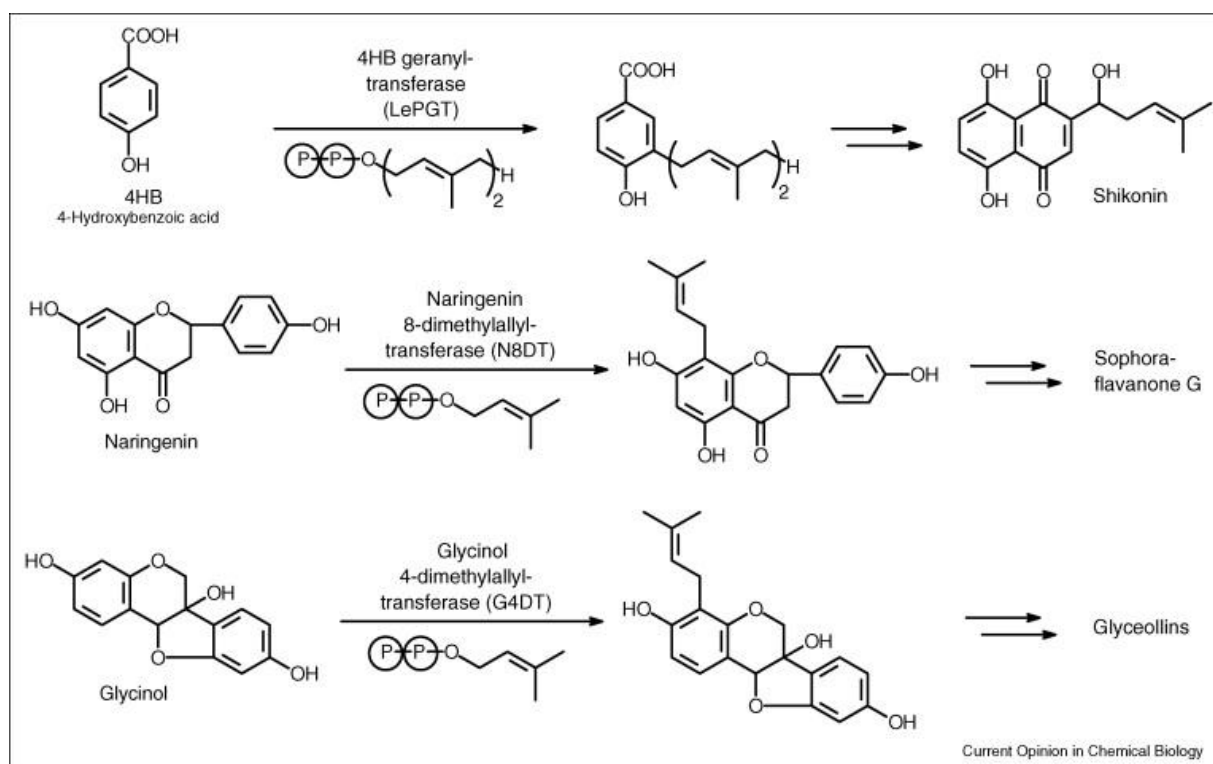


Abbildung 39: Von Prenyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels katalysierte Reaktionen (Heide 2009)

Die Aktivität der von (Boubakir et al. 2005) charakterisierten Prenyltransferase für den ersten Prenylierungsschritt der Hyperforinbiosynthese ist wie bei den oben beschriebenen Enzymen abhängig von der Gegenwart zweiwertiger Kationen. Allerdings handelt es sich um ein lösliches Enzym, womit es nicht in diese Familie eingegliedert werden kann. Die in *Cannabis sativa*-Blättern gefundene Olivetolat-Geranyltransferase (GOT) weist ebenfalls diese Eigenschaften auf (Fellermeier and Zenk 1998). Sie katalysiert die Prenylierung von Olivetolsäure mit GPP zur Cannabigerolsäure. Diese wird anschließend mittels Δ^1 -THCA-Synthase zu Δ^1 -Tetrahydrocannabinolsäure umgelagert [Abbildung 40]. Leider ist es bislang nicht gelungen die entsprechende cDNA zu klonieren.

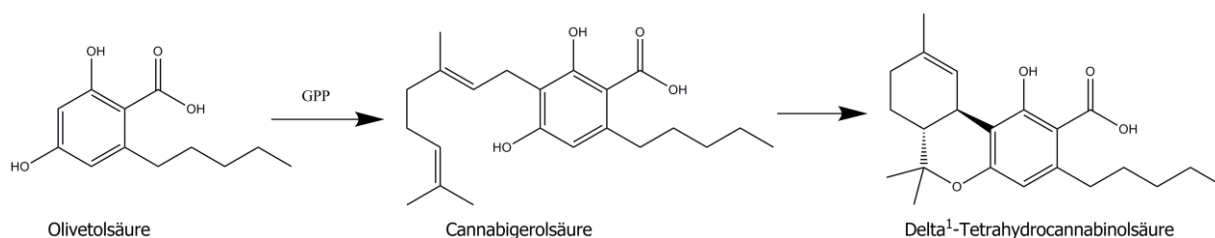


Abbildung 40: Prenylierung von Olivetolsäure in *Cannabis sativa*

Die in *Humulus lupulus* vorkommenden Bittersäuren sind mehrfach prenylierte Phloroglucine wie das Hyperforin [Abbildung 41]. Die Grundkörper werden bei der Biosynthese der α -Säuren (Humulone) zweifach und bei den β -Säuren (Lupulone) dreifach prenyliert (Van Cleemput et al. 2009). Der erste und zweite Prenylierungsschritt verläuft analog der Hyperforinbiosynthese. Beide Prenylierungsschritte wurden in Proteinextrakten aus Hopfenknospen und jungen Hopfenzapfen detektiert (Zuurbier et al. 1998). Die verantwortliche Enzymaktivität – es konnte noch nicht geklärt werden, ob es sich um ein oder zwei verschiedene Enzyme handelt – ist löslich, in seiner Aktivität abhängig von zweiwertigen Kationen und spezifisch für DMAPP. Damit weist sie die gleichen Eigenschaften auf wie die Prenyltransferase der Hyperforin-Biosynthese. Als bester Cofaktor wurden aber Mg^{2+} Ionen angegeben, während (Boubakir et al. 2005) Fe^{2+} als den effektivsten Cofaktor beschreiben. Allerdings wurde in den mit Hopfenextrakten durchgeführten



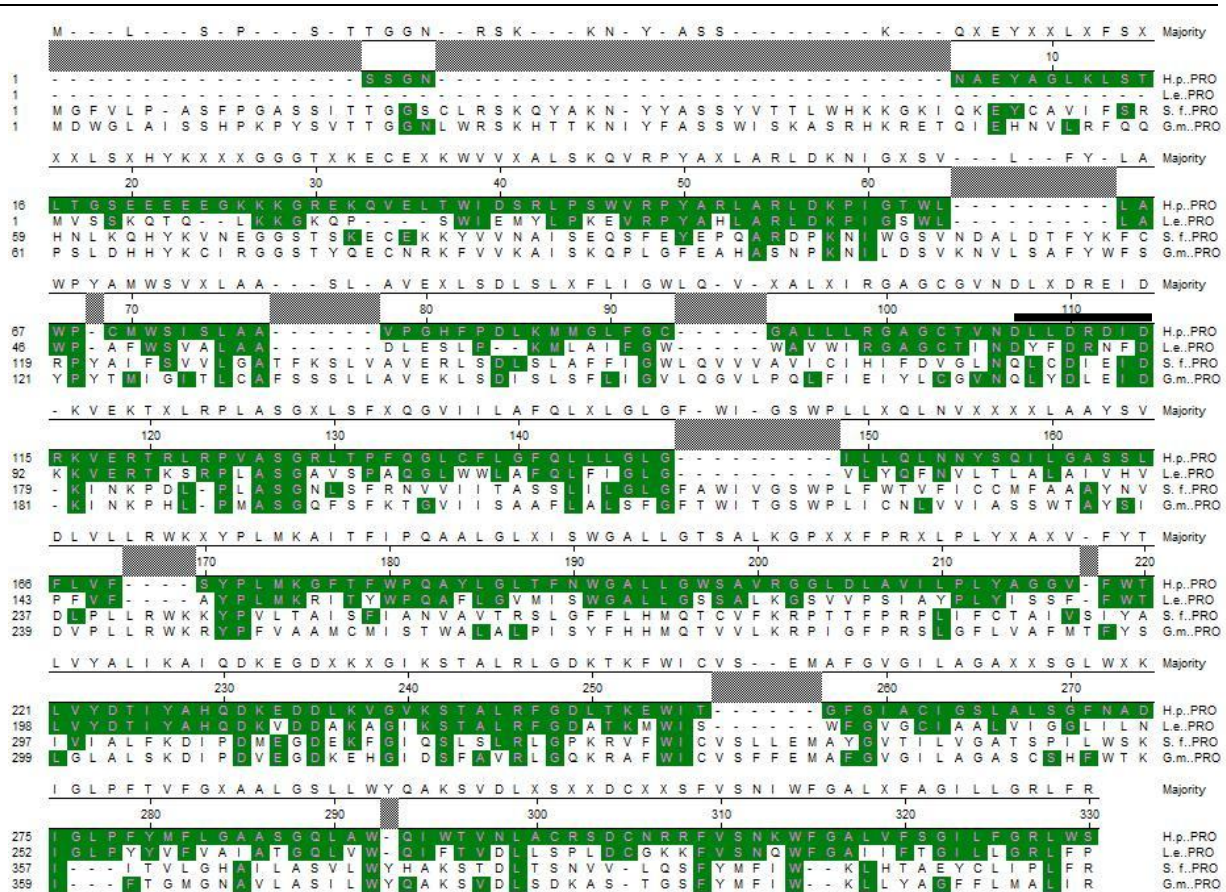
Es scheint sich bei den drei zuletzt beschriebenen Prenyltransferasen um eine weitere neue Familie zu handeln. Leider waren alle Aufreinigungsversuche bislang erfolglos.

Auch das hier klonierte cDNA-Fragment scheint aufgrund der bislang sechs putativen Transmembrandomänen nicht für die erste Prenyltransferase der Hyperforinbiosynthese zu kodieren. Das Enzym gliedert sich wahrscheinlich in die Familie der bereits bekannten Prenyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels ein. Die Möglichkeit, dass es für eine Prenyltransferase des Ubichinonstoffwechsels kodiert, besteht ebenfalls, erscheint aber aufgrund der organspezifischen Expression [IV.3] nicht sehr wahrscheinlich. Im Aminosäuresequenzvergleich mit den bekannten Prenyltransferasen aus *Sophora flavescens*, *Glycine max* und *Lithospermum erythrorhizon* [

Abbildung 42] ist zu sehen, dass kaum Gemeinsamkeiten mit den beiden für DMAPP spezifischen Prenyltransferasen bestehen. Dafür ist die Homologie zur für GPP spezifischen Prenyltransferase aus *Lithospermum erythrorhizon* mit 54,4% relativ hoch. Dies lässt vermuten, dass es sich bei dem hier klonierten Enzym ebenfalls um eine für GPP spezifische Prenyltransferase handelt. Eventuell katalysiert es den dritten Prenylierungsschritt in der Hyperforinbiosynthese, möglicherweise aber auch die Prenylierung von Benzophenonen oder Xanthonen, die ebenfalls in *Hypericum*-Spezies detektiert wurden (Schmidt and Beerhues 1997, Tanaka et al. 2004).

Nur eine Klonierung des vollständigen ORF mit anschließender Überexpression und Charakterisierung des gebildeten Proteins wird diese Frage abschließend klären können.

Diskussion



H.p.: Hypericum perforatum
S.f.: Sophora flavescens

L.e.: Lithospermum erythrorhizon
G.m.: Glycine max

Grün: Übereinstimmung mit Sequenz aus H.p.

Grau: in *H.perforatum* und *L. erythrorhizon* nicht vorkommende Sequenzabschnitte

Schwarzer Balken: Aspartatreiches Motiv, bei *H. perforatum* NDxxDxDxD

Abbildung 42: Vergleich der Aminosäuresequenzen des *H. perforatum*-Enzyms mit bekannten Prenyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels

Um die Prenylierungsschritte der Hyperforinbiosynthese molekularbiologisch aufzuklären, könnte es sinnvoll sein eine ähnliche Herangehensweise zu wählen wie (Sasaki et al. 2008) bei der Klonierung von SfN8DT-1 aus *Sophora flavescens*, wobei eine *H. perforatum*-cDNA Bibliothek gezielt nach putativ löslichen Proteinen mit aspartatreichen Motiven durchgemustert würde. Idealerweise könnte dieses Vorgehen im Vergleich mit einer cDNA-Bibliothek aus *Humulus lupulus* stattfinden. Da die charakterisierten Prenyltransferasen den gleichen Schritt katalysieren und

ähnliche Eigenschaften haben, könnten auch ihre Sequenzen einen hohen Grad an Homologie aufweisen. Ein solches Projekt bedeutet natürlich einen erheblichen finanziellen und zeitlichen Aufwand. Dennoch wäre es lohnenswert, die Biosynthese dieser pharmakologisch potenten Verbindungen rasch aufzuklären.

VI. Zusammenfassung

- Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L., Clusiaceae) ist eine alte Heilpflanze, deren Extrakte heutzutage erfolgreich in der antidepressiven Therapie eingesetzt werden.
- Das prenylierte Phloroglucinolderivat Hyperforin gilt als wirksamster Inhaltsstoff. Er beeinflusst die Wiederaufnahme der Neurotransmitter Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und L-Glutamat. Diese Breitbandwirkung ist einzigartig und basiert auf einem neuen Wirkmechanismus. Zusätzlich besitzt Hyperforin weitere vielversprechende pharmakologische Eigenschaften. Insbesondere auf das Potenzial bei vielen Krebszelllinien Apoptose zu induzieren werden große Hoffnungen gesetzt.
- Hyperforin wird in den oberirdischen Pflanzenteilen akkumuliert. In den Blüten und Früchten kann der Gehalt auf bis zu 8,5% ansteigen und macht Hyperforin damit zum quantitativ bedeutendsten Sekundärstoff im Johanniskraut. Wahrscheinlich erfüllt die Verbindung wichtige Abwehrfunktionen.
- Aufgrund der pharmakologischen Qualitäten wird der Bedarf an Hyperforin zunehmen. Eine chemische Totalsynthese ist aufgrund der Komplexität des Moleküls bislang nicht gelungen. Die Aufklärung der Biosynthese ist daher von höchstem Interesse, sie stützt sich bislang weitestgehend auf Vermutungen.
- Die Bildung des Grundgerüsts Phlorisobutyrophenon ist biochemisch aufgeklärt und wird katalysiert durch die Isobutyrophenon-Synthase (BUS). Durch vierfache Prenylierung des Grundgerüsts mit insgesamt fünf Isopreneinheiten und eine Zyklisierung entsteht Hyperforin. Der erste Prenylierungsschritt zum Prenyl-Phlorisobutyrophenon wurde detektiert und die Prenyltransferase charakterisiert.

- Prenyltransferasen gehören einer weitgefächerten Enzymfamilie an. Handelt es sich beim Akzeptormolekül um einen Aromaten, spricht man von „aromatischen Prenyltransferasen“, die sich in weitere Gruppen unterteilen lassen. Im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel katalysieren sie die Bildung unzähliger pharmakologisch interessanter Verbindungen. Es konnten bislang nur drei solcher Enzyme aus Pflanzen kloniert und charakterisiert werden. Alle sind membrangebunden und benötigen zweiwertige Kationen als Cofaktoren, die über ein aspartatreiches Motiv im aktiven Zentrum die Prenylierung unterstützen.
- Die beschriebene Prenyltransferase der Hyperforinbiosynthese ist ein lösliches Protein, das ebenfalls zweiwertige Kationen als Cofaktor benötigt. In *Humulus lupulus* und *Cannabis sativa* wurden Enzyme mit gleichen Eigenschaften entdeckt. Wahrscheinlich gehören sie einer neuen Unterfamilie an.
- Aus Zellkulturen und Pflanzen von *Hypericum perforatum* wurde mittels Homologieklonierung ein 400bp großes cDNA-Fragment gewonnen, welches für eine aromatische Prenyltransferase kodiert. Unter Einsatz der RACE-Technik konnte es bis zum 3'-Ende vervollständigt werden. Auf diesem Weg wurde ebenfalls eine Verlängerung zum 5'-Ende erreicht. Trotz mannigfaltiger Variation der RACE-Technik und auch mit einer Anzahl anderer Methoden konnte jedoch der komplette ORF nicht gewonnen werden. Die bisherige Länge des Klons beläuft sich auf 994 bp, was 330 AS entspricht. Ein aspartatreiches Motiv ist vorhanden.
- Die differenzielle Expression in verschiedenen Pflanzenteilen legt nahe, dass es sich um ein Enzym des Sekundärstoffwechsels handelt. In der bisherigen Aminosäuresequenz befinden sich sechs putative Transmembrandomänen. Damit handelt es sich wahrscheinlich nicht um die erste Prenyltransferase der Hyperforinbiosynthese. Es ist allerdings möglich, dass eine der weiteren Prenylierungsreaktionen von dem Enzym katalysiert wird.

VII. Literatur

- Adam, P., D. Arigoni, A. Bacher, and W. Eisenreich. 2002. Biosynthesis of hyperforin in *Hypericum perforatum*. *J Med Chem* 45: 4786-93.
- Akashi, T., K. Sasaki, T. Aoki, S.-i. Ayabe, and K. Yazaki. 2009. Molecular Cloning and Characterization of a cDNA for Pterocarpan 4-Dimethylallyltransferase Catalyzing the Key Prenylation Step in the Biosynthesis of Glyceollin, a Soybean Phytoalexin. *Plant Physiol.* 149: 683-693.
- Albert, D., I. Zundorf, T. Dingeremann, W. E. Muller, D. Steinhilber, and O. Werz. 2002. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* 64: 1767-75.
- Altschul, S., T. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Balibar, C. J., A. R. Howard-Jones, and C. T. Walsh. 2007. Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation. 3: 584-592.
- Barnes, J., L. A. Anderson, and J. D. Phillipson. 2001. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol* 53: 583-600.
- Beerhues, L. 2006. Hyperforin. *Phytochemistry* 67: 2201-7.
- Biber, A., H. Fischer, A. Romer, and S. S. Chatterjee. 1998. Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human volunteers. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1: 36-43.
- Bimboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Boubakir, Z., T. Beuerle, B. Liu, and L. Beerhues. 2005. The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. *Phytochemistry* 66: 51-7.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brattström, A. 2009. Long-term effects of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) treatment: A 1-year safety study in mild to moderate depression. *Phytomedicine* 16: 277-283.
- Bräuer, L., W. Brandt, D. Schulze, S. Zakharova, and L. Wessjohann. 2008. A Structural Model of the Membrane-Bound Aromatic Prenyltransferase UbiA from *E. coli*. *ChemBioChem* 9: 982-992.
- Butterweck, V. 2003. Mechanism of action of St John's wort in depression : what is known? *CNS Drugs* 17: 539-62.
- Butterweck, V., G. Jurgenliemk, A. Nahrstedt, and H. Winterhoff. 2000. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* 66: 3-6.
- Butterweck, V., and M. Schmidt. 2007. St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. *Wien Med Wochenschr* 157: 356-61.

- C.M. Schempp, B. W., R. Lüdtke, B. Simon-Haarhaus, E. Schöpf, J.C. Simon,. 2000. Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *British Journal of Dermatology* 142: 979-984.
- Case-Green, S. C., and E. M. Southern. 1994. Studies on the base pairing properties of deoxyinosine by solid phase hybridisation to oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 22: 131-6.
- Chang, S., J. Puryear, and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116.
- Charchoglyan, A., A. Abrahamyan, I. Fujii, Z. Boubakir, T. A. M. Gulder, T. M. Kutchan, H. Vardapetyan, G. Bringmann, Y. Ebizuka, and L. Beerhues. 2007. Differential accumulation of hyperforin and secohyperforin in *Hypericum perforatum* tissue cultures. *Phytochemistry* 68: 2670-2677.
- Chatterjee, S. S., S. K. Bhattacharya, M. Wonnemann, A. Singer, and W. E. Müller. 1998. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sciences* 63: 499-510.
- Chatterjee, S. S., A. Biber, and C. Weibezahn. 2001. Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin. *Pharmacopsychiatry* 34 Suppl 1: S11-9.
- Christianson, D. W. 2008. Unearthing the roots of the terpenome. *Current Opinion in Chemical Biology/Biocatalysis and biotransformation/Bioinorganic chemistry* 12: 141-150.
- Edwards, D. J., and W. H. Gerwick. 2004. Lyngbyatoxin Biosynthesis: Sequence of Biosynthetic Gene Cluster and Identification of a Novel Aromatic Prenyltransferase. *Journal of the American Chemical Society* 126: 11432-11433.
- F. Cramer, W. B. 1959. Synthese von Geranyl- und Farnesyl-pyrophosphat. *Angewandte Chemie* 71: 775.
- F. Lang, A. B., C. Erdelmeier,. 2002. Phytopharmaka Hyperforin in Johanniskraut-Droge, -Extrakten und -Präparaten. *Pharmazie in unserer Zeit* 31: 512-514.
- Fellermeier, M., and M. H. Zenk. 1998. Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Letters* 427: 283-285.
- Franklin, G., L. F. Conceicao, E. Kombrink, and A. C. Dias. 2009. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry* 70: 60-8.
- Frohman, M. A., M. K. Dush, and G. R. Martin. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 8998-9002.
- Gartner, M., T. Muller, J. C. Simon, A. Giannis, and J. P. Sleeman. 2005. Aristoforin, a novel stable derivative of hyperforin, is a potent anticancer agent. *Chembiochem* 6: 171-7.
- Gastpar, M., A. Singer, and K. Zeller. 2006. Comparative Efficacy and Safety of a Once-Daily Dosage of *Hypericum* Extract STW3-VI and Citalopram in Patients with Moderate Depression: A Double-Blind, Randomised, Multicentre, Placebo-Controlled Study. *Pharmacopsychiatry* 39: 66-75.

- Godtel-Armbrust, U., A. Metzger, U. Kroll, O. Kelber, and L. Wojnowski. 2007. Variability in PXR-mediated induction of CYP3A4 by commercial preparations and dry extracts of St. John's wort. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375: 377-82.
- Gronquist, M., A. Bezzerides, A. Attygalle, J. Meinwald, M. Eisner, and T. Eisner. 2001. Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13745-50.
- Guo, R. T., T. P. Ko, A. P. Chen, C. J. Kuo, A. H. Wang, and P. H. Liang. 2005. Crystal structures of undecaprenyl pyrophosphate synthase in complex with magnesium, isopentenyl pyrophosphate, and farnesyl thiopyrophosphate: roles of the metal ion and conserved residues in catalysis. *J Biol Chem* 280: 20762-74.
- Gutmann, H., B. Poller, K. B. Buter, A. Pfrunder, W. Schaffner, and J. Drewe. 2006. *Hypericum perforatum*: which constituents may induce intestinal MDR1 and CYP3A4 mRNA expression? *Planta Med* 72: 685-90.
- Haagen, Y., I. Unsöld, L. Westrich, B. Gust, S. B. Richard, J. P. Noel, and L. Heide. 2007. A soluble, magnesium-independent prenyltransferase catalyzes reverse and regular C-prenylations and O-prenylations of aromatic substrates. *FEBS Letters* 581: 2889-2893.
- Hänsel, R., O. Sticher, and E. Steinegger. 1999. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Springer Berlin.
- Heide, L. 2009. Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Current Opinion in Chemical Biology Molecular Diversity* 13: 171-179.
- Holloway, P. W., and G. Popjak. 1967. The purification of 3,3-dimethylallyl- and geranyl-transferase and of isopentenyl pyrophosphate isomerase from pig liver. *Biochem J* 104: 57-70.
- Hostanska, K., J. Reichling, S. Bommer, M. Weber, and R. Saller. 2003. Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *Eur J Pharm Biopharm* 56: 121-32.
- Jaakola, L., A. M. Pirttilä, M. Halonen, and A. Hohtola. 2001. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Mol Biotechnol* 19: 201-3.
- K. C. Nicolaou, Giacomo E. A. Carenzi, and Valer Jeso. 2005. Construction of Highly Functionalized Medium-Sized Rings: Synthesis of Hyperforin and Perforatumone Model Systems. *Angewandte Chemie* 117: 3963-3967.
- Kalb, R., R. D. Trautmann-Sponsel, and M. Kieser. 2001. Efficacy and tolerability of hypericum extract WS 5572 versus placebo in mildly to moderately depressed patients. A randomized double-blind multicenter clinical trial. *Pharmacopsychiatry* 34: 96-103.
- Karppinen, K., J. Hokkanen, A. Tolonen, S. Mattila, and A. Hohtola. 2007. Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry* 68: 1038-45.
- Kasper, S., I. G. Anghelescu, A. Szegedi, A. Dienel, and M. Kieser. 2006. Superior efficacy of St John's wort extract WS 5570 compared to placebo in patients with major depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial [ISRCTN77277298]. *BMC Med* 4: 14.

- Klingauf, P., T. Beuerle, A. Mellenthin, S. A. El-Moghazy, Z. Boubakir, and L. Beerhues. 2005. Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. *Phytochemistry* 66: 139-45.
- Kremer, A., and S.-M. Li. 2008. Tryptophan Aminopeptidase Activity of Several Indole Prenyltransferases from *Aspergillus fumigatus*. *Chemistry & Biology* 15: 729-738.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567-80.
- Kuzuyama, T., J. P. Noel, and S. B. Richard. 2005. Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. 435: 983-987.
- Lee, J. Y., R. K. Duke, V. H. Tran, J. M. Hook, and C. C. Duke. 2006. Hyperforin and its analogues inhibit CYP3A4 enzyme activity. *Phytochemistry* 67: 2550-60.
- Liang, P., and A. B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-71.
- Linde, K., M. Berner, M. Egger, and C. Mulrow. 2005. St John's wort for depression: meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Psychiatry* 186: 99-107.
- Linsmaier, E. M., and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 18: 100-127.
- Liu, B., H. Falkenstein-Paul, W. Schmidt, and L. Beerhues. 2003. Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases. *Plant J* 34: 847-55.
- Long, S. B., P. J. Casey, and L. S. Beese. 2002. Reaction path of protein farnesyltransferase at atomic resolution. 419: 645-650.
- Lopez, J., S. Ryan, and R. Blankenship. 1996. Sequence of the bchG gene from *Chloroflexus aurantiacus*: relationship between chlorophyll synthase and other polyprenyltransferases. *J. Bacteriol.* 178: 3369-3373.
- Lu, Y. P., H. G. Liu, and P. H. Liang. 2009. Different reaction mechanisms for cis- and trans-prenyltransferases. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 351-5.
- Maisenbacher, P., and K.-A. Kovar. 1992. Adhyperforin: A Homologue of Hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Planta Med* 58: 291-293.
- Mandel, M., and A. Higa. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology* 53: 159-162.
- Maurer-Stroh, S., S. Washietl, and F. Eisenhaber. 2003. Protein prenyltransferases. *Genome Biol* 4: 212.
- Miyawaki, K., P. Tarkowski, M. Matsumoto-Kitano, T. Kato, S. Sato, D. Tarkowska, S. Tabata, G. r. Sandberg, and T. Kakimoto. 2006. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 16598-16603.
- Moore, L. B., B. Goodwin, S. A. Jones, G. B. Wisely, C. J. Serabjit-Singh, T. M. Willson, J. L. Collins, and S. A. Klierer. 2000. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7500-2.
- Müller, W. E. 2003. Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacological Research* 47: 101-109.

- Mutschler, E., G. Geisslinger, H. K. Kroemer, and M. Schäfer-Korting. 2001. *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Nahrstedt, A., and V. Butterweck. 1997. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl 2: 129-34.
- Obach, R. S. 2000. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 88-95.
- Ogura, K., T. Koyama, and H. Sagami. 1997. Polyprenyl diphosphate synthases. *Subcell Biochem* 28: 57-87.
- Ohara, K., K. Yamamoto, M. Hamamoto, K. Sasaki, and K. Yazaki. 2006. Functional Characterization of OsPPT1, Which Encodes p-Hydroxybenzoate Polyprenyltransferase Involved in Ubiquinone Biosynthesis in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* 47: 581-590.
- Okada, K., K. Ohara, K. Yazaki, K. Nozaki, N. Uchida, M. Kawamukai, H. Nojiri, and H. Yamane. 2004. The AtPPT1 gene encoding 4-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase in ubiquinone biosynthesis is required for embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 55: 567-577.
- O'Maille, P. E., A. Malone, N. Dellas, B. Andes Hess, Jr., L. Smentek, I. Sheehan, B. T. Greenhagen, J. Chappell, G. Manning, and J. P. Noel. 2008. Quantitative exploration of the catalytic landscape separating divergent plant sesquiterpene synthases. *Nat Chem Biol* 4: 617-23.
- Payandeh, J., M. Fujihashi, W. Gillon, and E. F. Pai. 2006. The Crystal Structure of (S)-3-O-Geranylgeranylglycerol Phosphate Synthase Reveals an Ancient Fold for an Ancient Enzyme. *J. Biol. Chem.* 281: 6070-6078.
- Pojer, F., E. Wemakor, B. Kammerer, H. Chen, C. T. Walsh, S.-M. Li, and L. Heide. 2003. CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 2316-2321.
- Poulter, C. 2006. Farnesyl Diphosphate Synthase. A Paradigm for Understanding Structure and Function Relationships in E-polyprenyl Diphosphate Synthases. *Phytochemistry Reviews* 5: 17-26.
- Poulter, C. D., and H. C. Rilling. 1978. The prenyl transfer reaction. Enzymic and mechanistic studies of the 1'-4 coupling reaction in the terpene biosynthetic pathway. *Accounts of Chemical Research* 11: 307-313.
- Quiney, C., C. Billard, C. Salanoubat, J. D. Fourneron, and J. P. Kolb. 2006. Hyperforin, a new lead compound against the progression of cancer and leukemia? *Leukemia* 20: 1519-25.
- Rahimi, R., S. Nikfar, and M. Abdollahi. 2009. Efficacy and tolerability of *Hypericum perforatum* in major depressive disorder in comparison with selective serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 118-27.
- Reichling, J., A. Weseler, and R. Saller. 2001. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 34 Suppl 1: S116-8.
- Repcák, M., and P. Mártonfi. 1997. The localization of secondary substances in *Hypericum perforatum* flower. *Biologia* 52: 91-94.

-
- Rohmer, M. 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* 16: 565-74.
- Ruschitzka, F., P. J. Meier, M. Turina, T. F. Luscher, and G. Noll. 2000. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet* 355: 548-9.
- Sambrook, J., and P. MacCallum. 2001a. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.— 2001b. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Sasaki, K., K. Mito, K. Ohara, H. Yamamoto, and K. Yazaki. 2008. Cloning and Characterization of Naringenin 8-Prenyltransferase, a Flavonoid-Specific Prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiol.* 146: 1075-1084.
- Schempp, C. M., V. Kirkin, B. Simon-Haarhaus, A. Kersten, J. Kiss, C. C. Termeer, B. Gilb, T. Kaufmann, C. Borner, J. P. Sleeman, and J. C. Simon. 2002. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* 21: 1242-50.
- Schempp, C. M., K. Pelz, A. Wittmer, E. Schopf, and J. C. Simon. 1999. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet* 353: 2129.
- Schempp, C. M., T. Windeck, S. Hezel, and J. C. Simon. 2003. Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream - a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. *Phytomedicine* 10: 31-37.
- Schmidt, W., and L. Beerhues. 1997. Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. *FEBS Letters* 420: 143-146.
- Sirvent, T. M., S. B. Krasnoff, and D. M. Gibson. 2003. Induction of Hypericins and Hyperforins in *Hypericum perforatum* in Response to Damage by Herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 29: 2667-2681.
- Soelberg, J., L. B. Jorgensen, and A. K. Jager. 2007. Hyperforin Accumulates in the Translucent Glands of *Hypericum perforatum*. *Ann Bot* 99: 1097-1100.
- Szegedi, A., R. Kohnen, A. Dienel, and M. Kieser. 2005. Acute treatment of moderate to severe depression with *hypericum* extract WS 5570 (St John's wort): randomised controlled double blind non-inferiority trial versus paroxetine. *BMJ* 330: 503-.
- Tan, G., Y. Gao, M. Shi, X. Zhang, S. He, Z. Chen, and C. An. 2005. SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucl. Acids Res.* 33: e122-.
- Tanaka, N., Y. Takaishi, Y. Shikishima, Y. Nakanishi, K. Bastow, K.-H. Lee, G. Honda, M. Ito, Y. Takeda, O. K. Kodzhimatov, and O. Ashurmetov. 2004. Prenylated Benzophenones and Xanthones from *Hypericum scabrum*. *Journal of Natural Products* 67: 1870-1875.
- Tarshis, L. C., P. J. Proteau, B. A. Kellogg, J. C. Sacchettini, and C. D. Poulter. 1996. Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 15018-15023.

- Tekel'ova, D., M. Repcak, E. Zemkova, and J. Toth. 2000. Quantitative changes of dianthrone, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. *Planta Med* 66: 778-80.
- Tello, M., T. Kuzuyama, L. Heide, J. Noel, and S. Richard. 2008. The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 1459-1463.
- Thulasiram, H. V., H. K. Erickson, and C. D. Poulter. 2007. Chimeras of Two Isoprenoid Synthases Catalyze All Four Coupling Reactions in Isoprenoid Biosynthesis. *Science* 316: 73-76.
- Treiber, K., A. Singer, B. Henke, and W. E. Müller. 2005. Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). *Br J Pharmacol* 145: 75-83.
- Tsai, H. F., H. Wang, J. C. Gebler, C. D. Poulter, and C. L. Schardl. 1995. The *Claviceps purpurea* Gene Encoding Dimethylallyltryptophan Synthase, the Committed Step for Ergot Alkaloid Biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216: 119-125.
- Umek, A., S. Kreft, T. Kartnig, and B. Heydel. 1999. Quantitative phytochemical analyses of six *hypericum* species growing in slovenia. *Planta Med* 65: 388-90.
- Van Cleemput, M., K. Cattoor, K. De Bosscher, G. Haegeman, D. De Keukeleire, and A. Heyerick. 2009. Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *Journal of Natural Products* 72: 1220-1230.
- Verotta, L., G. Appendino, E. Belloro, J. Jakupovic, and E. Bombardelli. 1999. Furohyperforin, a prenylated phloroglucinol from st. John's wort (*Hypericum perforatum*). *J Nat Prod* 62: 770-2.
- Wang, E. J., M. Barecki-Roach, and W. W. Johnson. 2004. Quantitative characterization of direct P-glycoprotein inhibition by St John's wort constituents hypericin and hyperforin. *J Pharm Pharmacol* 56: 123-8.
- Wang, E. J., C. N. Casciano, R. P. Clement, and W. W. Johnson. 2001. Active transport of fluorescent P-glycoprotein substrates: evaluation as markers and interaction with inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 580-5.
- Weber, C. C., S. Kressmann, G. Fricker, and W. E. Müller. 2004. Modulation of P-Glycoprotein Function by St John's Wort Extract and its Major Constituents. *Pharmacopsychiatry* 37: 292-298.
- Williams, R., E. Stocking, and J. Sanz-Cervera. 2000. Biosynthesis of Prenylated Alkaloids Derived from Tryptophan. Pages 97-173. *Biosynthesis*.
- Wittchen, H.-U., and F. Jacobi. 2005. Size and burden of mental disorders in Europe - a critical review and appraisal of 27 studies. *European Neuropsychopharmacology Size & Burden of Mental Disorders in Europe* 15: 357-376.
- Yazaki, K., M. Kuniyoshi, T. Fujisaki, and F. Sato. 2002. Geranyl Diphosphate:4-Hydroxybenzoate Geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. CLONING AND CHARACTERIZATION OF A KEY ENZYME IN SHIKONIN BIOSYNTHESIS. *J. Biol. Chem.* 277: 6240-6246.
- Young, C. A., S. Felitti, K. Shields, G. Spangenberg, R. D. Johnson, G. T. Bryan, S. Saikia, and B. Scott. 2006. A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 679-693.
- Zhao, P., K. Inoue, I. Kouno, and H. Yamamoto. 2003. Characterization of Leachianone G 2'' -Dimethylallyltransferase, a Novel Prenyl Side-Chain

- Elongation Enzyme for the Formation of the Lavandulyl Group of Sophoraflavanone G in *Sophora flavescens* Ait. Cell Suspension Cultures. *Plant Physiol.* 133: 1306-1313.
- Zuurbier, K. W. M., S.-Y. Fung, J. J. C. Scheffer, and R. Verpoorte. 1998. In-vitro prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *humulus lupulus*. *Phytochemistry* 49: 2315-2322.

VIII. Anhang

Bisherige Nukleotidsequenz der klonierten Prenyltransferase aus *Hypericum perforatum*:

AGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGGGCTAAAGTTGTCGACTTTAACGGGATCGGAG
GAGGAGGAGGAGGGGAAAAAGAAGGGGAGGGAGAAGCAAGTGGAGCTGACGTGGATCGA
CTCGCGGTTGCCGAGCTGGGTTCGGCCCTACGCGCGGCTCGCTCGGCTCGACAAGCCGAT
CGGGACCTGGCTCCTCGCTTGGCCCTGTATGTGGTCGATTTGCTGGCGGCAGTGCCGGG
GCATTTTCCGGATTTGAAGATGATGGGGTTGTTTGGTTGCGGGGCTTTGCTTTTGCCTGGC
GCTGGGTGTACTGTCAATGACCTTCTTGACAGAGATATCGATAGAAAGGTGGAGCGAACA
GRCTGCGTCCGGTTGCAAGTGGTCGTCTGACTCCCTTTCAAGGTCTTTGCTTTCTTGGTTT
TCAGTTGCTCTTGGGTCTTGGTATTCTTCTCCAAGTGAATAATTACAGTCAAATTTAGGAG
CTTCGTCATTGTTCTAGTTTTCTCGTATCCCCTCATGAAAGGATTTACATTTTGGCCTCAA
GCCTATCTTGGTCTCACATTCAATTGGGGAGCTTTATTAGGCTGGTCTGCAGTTAGGGGAG
GATTAGATCTAGCTGTTATACTGCCGCTCTATGCTGGTGGAGTGTTTTGGACTCTGGTCTA
TGACACAATATACGCACACCAAGACAAGGAAGATGATTTGAAAGTGGGTGTTAAATCGACG
GCGTTGAGATTTGGAGATTTAACGAAAGAGTGGATCACTGGATTTGGGATTGCATGCATTG
GTAGCCTTGCCCTCAGTGGATTCAATGCAGATATTGGCTTGCCTTTCTATATGTTTTTGGG
AGCAGCATCTGGACAATTAGCTTGGCAAATCTGGACAGTAAACCTTGCATGCCGGTCAGAT
TGCAATAGGAGGTTTGTTCAAACAAATGGTTTGGTGCCTGGTTTTACGCGGGATTCTGT
TTGGTAGACTCTGGTCATAAA

Korrespondierende Aminosäuresequenz:

SSGNNAEYAGLKLSTLTGSEEEEEGKKKGREKQVELTWIDSRLPSWVRPYARLARLDKPIGTW
LLAWPCMWSISLAAPVGHFDPDLKMMGLFGCGALLLRGAGCTVNDLLDRDIDRKVERTRLRPV
ASGRLTPFQGLCFLGFQLLLGLGILLQLNNYSQILGASSLFLVFSYPLMKGFTFWPQAYLGLTFN
WGALLGWSAVRGGLDLAVILPLYAGGVFWTLVYDTIYAHQDKEDDLKVGKSTALRFGDLTK
EWITGFGIACIGSLALSGFNADIGLPFYMFLGAASGQLAWQIWTVNLACRSDCNRRFVSNKWF
GALVFSGILFGRLWS.

Lebenslauf

Susanne Kühle

Geboren am 10.03.1979 in Magdeburg

SCHULBILDUNG

1985- 1989	Katja-Niederkirchner-Oberschule, Domersleben
1989- 1990	Sohnreyschule, Einbeck
1990- 1991	Bildungszentrum Markdorf
1991- 1997	Norbertusgymnasium, Magdeburg (Abitur nach Klasse 12)

AUSLANDSAUFENTHALTE

1997- 1998	Aufenthalt in London zur Erweiterung der englischen Sprachkenntnisse
Feb-März 2003	Praktikum am Centro de Investigación Biomédica del Occidente (CIBO) in Guadalajara, Mexiko

STUDIUM

1998- 2003	Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
2004	Pharmaziepraktikum am Institut für Pharmazeutische Biologie der TU- Braunschweig (6 Monate) Pharmaziepraktikum in der „Apotheke am Fennpfuhl“ in Berlin, Lichtenberg (6 Monate)
11.02.2005	Erteilung der Approbation als Apothekerin

AKTUELLE TÄTIGKEIT

Seit Mai 2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Biologie der TU-Braunschweig
---------------	--